

# Vergleichende Wirksamkeitsprüfung neuartiger, auf hauteigenen Ceramidbausteinen basierender kosmetischer Wirkstoffe

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
**D i s s e r t a t i o n**

von Yvonne Schiemann  
aus Heide

1. Referentin: Professor Dr. Petra Mischnick
2. Referentin: Professor Dr. Christel Müller-Goymann

eingereicht am: 06.11.2006

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.01.2007

Druckjahr 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2002 bis August 2005 bei der Degussa AG unter Betreuung von Herrn Dr. P. Lersch und Frau Prof. Dr. P. Mischnick durchgeführt.

## Danksagung

Frau Prof. Dr. P. Mischnick danke ich für die hervorragende Betreuung, die große Flexibilität und die gewährten Forschungsfreiräume.

Frau Prof. Dr. C.C. Müller-Goymann für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. P. Lersch für die ausgezeichneten Hilfestellungen, Unterstützungen und Förderungen, sowie für die exzellente Betreuung.

Herrn Dr. M. Farwick für die wissenschaftliche Unterstützung, die konstruktive und hilfreiche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. S. Schaffer und Herrn Dr. T. Köhler für Anregungen und Hilfestellungen, sowie netter Abende voller Diskussionen.

Unsere Kooperanden des Uniklinikums Regensburg: Dr. P. Schling, bei der experimentellen Durchführung der Untersuchungen an humanen Keratinozyten.

Den Mitarbeitern im Labor Hanau: N. Albrecht, D. Börgel, T. Hüller, für die ständige und unkomplizierte Hilfe.

Der Mitarbeiterin N. Borgards für die Unterstützung im Labor.

Meinen Kollegen im Labor-Essen, die mir das Laborleben sehr bereichert haben. Mein besonderer Dank geht an K. Fürch, C. Dietl, A. Seifert, G. Lerche, P. Ulrich, H. Blasko-Begoihn, U. Maczkiewitz, U. Wollenweber und M. Mecking für Ihre Hilfe und die erfrischende und lebenswerte Lebensart.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL.....</b>	<b>3</b>
2.1	Ceramide und ihre Aufgaben in der Haut.....	3
2.2	Sphingolipide im Stratum corneum.....	3
2.3	Synthesekonzept neuer Wirkstoffe.....	9
2.4	Wirkstoffprüfung .....	11
2.5	Methoden zur Wirksamkeitsprüfung .....	13
2.5.1	Aufbau und Differenzierungsprozess der Epidermis .....	13
2.6	Hautmodelle und Zellkulturen.....	18
2.7	Penetrationswege.....	21
2.7.1	Modulation des Stofftransportes durch die Haut .....	21
2.7.2	Hautpenetration – die komplexen Parameter .....	22
2.7.3	Verteilungskoeffizient Octanol / Wasser ( $\log P_{O/W}$ ).....	23
2.8	Bestimmung der Wirksamkeit durch Genexpressionen.....	24
2.8.1	Microarray.....	24
2.8.2	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>32</b>
3.1	Material.....	32
3.1.1	Lösungen.....	34
3.1.2	Geräte.....	34
3.1.3	Analytische Gerätedaten .....	36
3.2	Methoden.....	37
3.2.1	Darstellung von <i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin (4a) .....	37
3.2.2	Charakterisierung der Verbindung <i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin (4a) .....	39
3.2.3	Darstellung von <i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin (4b) .....	42
3.2.4	Charakterisierung der Verbindung <i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin (4b) .....	43
3.3	Präparation der Keratinozyten für die Zytotoxizitätsanalyse .....	46
3.4	Bestimmung der Zytotoxizität .....	47
3.4.1	Bestimmung der Aktivität von Lactatdehydrogenase .....	47
3.4.2	ViaLight™ Plus .....	48
3.4.3	ToxiLight™ .....	51
3.5	Präparation der Keratinozyten für die Chipanalyse .....	52

3.6	Mikroskopische Bestimmungen .....	52
3.7	Expressionsanalyse mittels DNA-Chips.....	53
3.8	Herstellung der Cremeformulierung für die Hautmodelle .....	54
3.9	Applikation von Substanzen auf die Hautmodelle .....	54
3.9.1	Präparation von RNA aus den Hautmodellen .....	55
3.9.2	Erststrangsynthese .....	56
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
4.1	Berechnung der log P <sub>O/W</sub> -Werte mittels der Programme Daylight und Syrres.....	59
4.1.1	Bewertung der log P <sub>O/W</sub> -Ergebnisse .....	60
4.2	Penetrationsuntersuchungen .....	60
4.3	Zytotoxizitätsergebnisse.....	61
4.3.1	Auswertung der LDH-Freisetzung .....	62
4.3.2	ViaLight™ Plus .....	67
4.3.3	ToxiLight™ .....	72
4.3.4	Zusammenfassung der Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	77
4.4	Mikroskopische Ergebnisse .....	79
4.4.1	Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen der Keratinozyten.....	80
4.5	Isolation der RNA aus den Keratinozyten .....	85
4.6	DNA-Chip-Ergebnisse.....	91
4.7	Validierung der Hautmodelle.....	95
4.7.1	Auswertung der zytotoxischen Bestimmung der Hautmodelle (Leerformulierungen).....	95
4.7.2	Isolierte RNA-Mengen der Hautmodelle (Leerformulierungen).....	97
4.7.3	$\Delta$ CT-Vergleich der Hautmodelle (Leerformulierung) mit isolierter menschlicher RNA .....	98
4.7.4	Auswertung der zytotoxischen Untersuchung der Hautmodelle (Vergleichssubstanz: Retinol) .....	101
4.7.5	Isolierte RNA-Mengen der Hautmodelle (Vergleichssubstanz).....	103
4.7.6	PCR Auswertung der Hautmodelle (Vergleichssubstanz).....	103
4.8	$\Delta$ CT Vergleich der Hautmodelle (48 Stunden / Leerformulierung) mit isolierter menschlicher RNA .....	106
4.9	Auswertung der zytotoxischen Bestimmung der Hautmodelle (Wirkstoffe) ....	108
4.10	Bestimmung der total RNA Mengen aus dem Hautmodell (Wirkstoffe) .....	110
4.10.1	Methodenkontrolle durch Berechnung der 2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>CT</sup> Werte ausgewählter Marker (ARP und $\beta$ -Actin) .....	112
4.10.2	PCR-Auswertung der Hautmodelle (Wirkstoffe).....	113



<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>119</b>
5.1	Diskussion der Keratinozytenergebnisse .....	120
5.2	Diskussion der DNA-Chip-Ergebnisse.....	121
5.3	Diskussion der Hautmodellergebnisse .....	123
5.4	Diskussion der RT-PCR-Ergebnisse (Wirkstoffe).....	124
5.5	Abgleich der Methoden.....	124
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>142</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b>	Struktur der im <i>Stratum corneum</i> vorkommenden Sphingolipidbasen	5
<b>Abbildung 2:</b>	Struktur der Sphingolipide	6
<b>Abbildung 3:</b>	Struktur der im humanen <i>Stratum corneum</i> vorkommenden Ceramidtypen [Ponec, 2003]. Die Bezeichnungen der Ceramide in Klammern folgt der Nomenklatur nach Motta et al., 1993	7
<b>Abbildung 4:</b>	Reaktionsschema der synthetisierten Verbindungen ( <b>4a,b</b> )	10
<b>Abbildung 5:</b>	Kommerziell erworbene Verbindungen ( <b>4c,d</b> )	11
<b>Abbildung 6:</b>	Schematischer Aufbau der Epidermis, [anne_rats, 2006]	15
<b>Abbildung 7:</b>	Penetrationswege in die menschliche Haut (modifiziert nach Neubert, 2001)	21
<b>Abbildung 8:</b>	Prinzip eines Affymetrix-GeneChip®, Array Scan [modifiziert nach Kussebin, 2003]	26
<b>Abbildung 9:</b>	Schematische Darstellung der PCR. A) Die cDNA mit der Zielsequenz wird durch Hitzeeinwirkung in die Einzelstränge aufgeschmolzen. B) Durch Wiederholungen des Temperaturprogramms nimmt die Gesamt- Produktmenge expotentiell zu. C) Hieraus entsteht in den weiteren Zyklen das gewünschte, beidseitig terminierte Produkt [Wilhelm, J, 2003]	28
<b>Abbildung 10:</b>	Typischer Verlauf einer PCR-Kurve gemessen mit dem DNA Engine Opticon anhand einer Testsubstanz CT-Wert: Schwellenwert-Zyklus (Threshold cycle)	30
<b>Abbildung 11:</b>	Schmelzkurvenverlauf eines PCR-Laufes gemessen mit dem DNA Engine Opticon anhand einer Testsubstanz	31
<b>Abbildung 12:</b>	Syntheschema zur Darstellung von <i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> )	37
<b>Abbildung 13:</b>	Nummerierung der Verbindung <b>4a</b> für die spektroskopische Auswertung	40
<b>Abbildung 14:</b>	Syntheschema zur Darstellung von <i>N</i> -Hexanoyl- phytosphingosin ( <b>4b</b> )	42
<b>Abbildung 15:</b>	Nummerierung der Verbindung <b>4b</b> für die spektroskopische Auswertung	45
<b>Abbildung 16:</b>	Reaktion der Lactatdehydrogenase	47
<b>Abbildung 17:</b>	ViaLight™ Plus, ATP Bestimmungsschema	48
<b>Abbildung 18:</b>	Reaktionsschritte bei der Biolumineszenzreaktion des Luciferins	49
<b>Abbildung 19:</b>	ToxiLight™, Bestimmungsmethode zur Freisetzung des Enzyms Adenylatkinase (2. Stufe: Abbildung 18)	51

<b>Abbildung 20:</b>	Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Freisetzung von LDH in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am ersten Tag	63
<b>Abbildung 21:</b>	Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Freisetzung von LDH in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am ersten Tag	64
<b>Abbildung 22:</b>	Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Freisetzung von LDH in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am vierten Tag	65
<b>Abbildung 23:</b>	Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Freisetzung von LDH in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am vierten Tag	66
<b>Abbildung 24:</b>	Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Interzelluläres ATP-Niveau am ersten Tag in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration	68
<b>Abbildung 25:</b>	Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Interzelluläres ATP-Niveau am ersten Tag in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration	69
<b>Abbildung 26:</b>	Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Interzelluläres ATP-Niveau am vierten Tag in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration	70
<b>Abbildung 27:</b>	Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Interzelluläres ATP-Niveau am vierten Tag in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration	71
<b>Abbildung 28:</b>	Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Freisetzung der Adenylatkinase in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am ersten Tag	73
<b>Abbildung 29:</b>	Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Freisetzung der Adenylatkinase in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am ersten Tag	74
<b>Abbildung 30:</b>	Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Freisetzung der Adenylatkinase in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am vierten Tag	75
<b>Abbildung 31:</b>	Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Freisetzung der Adenylatkinase in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am vierten Tag	76
<b>Abbildung 32:</b>	Keratinozytenmorphologie A: Proliferierende Keratinozyten in einem frühen Stadium [Miyata et al., 2004]; B: Migrierende Keratinozyten [Tasanen et al., 2004]; C: Seneszente Keratinozyten in einem späten Stadium [Miyata et al., 2004]	79

<b>Abbildung 33:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Keratinozytentypen am Tag null	80
<b>Abbildung 34:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 1 am ersten Tag	81
<b>Abbildung 35:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 2 am ersten Tag	81
<b>Abbildung 36:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 1 am vierten Tag	81
<b>Abbildung 37:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 2 am vierten Tag	82
<b>Abbildung 38:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit Retinol (25 µM) am ersten Tag	82
<b>Abbildung 39:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit Retinol (25 µM) am vierten Tag	82
<b>Abbildung 40:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit <i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin ( <b>4d</b> ) (25 µM) am ersten Tag	83
<b>Abbildung 41:</b>	Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit <i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> ) (25 µM) am ersten Tag	84
<b>Abbildung 42:</b>	Isolierte RNA-Mengen aus den Keratinozyten der Zelllinie H 604, H 614 und H 625 nach einer Applikationszeit der Test- und Kontrollsubstanzen von 24 Stunden (Tabelle 13)	86
<b>Abbildung 43:</b>	Isolierte RNA-Mengen aus den Keratinozyten der Zelllinie H 604, H 614 und H 625 nach einer Applikationszeit der Test- und Kontrollsubstanzen von 96 Stunden (Tabelle 14)	88
<b>Abbildung 44:</b>	LDH-Freisetzung in das Kulturmedium der Hautmodelle nach einer Applikationsdauer der Leerformulierungen von 24, 48 und 72 Stunden	96
<b>Abbildung 45:</b>	Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) in das Kulturmedium der Hautmodelle nach einer Applikationsdauer der Leerformulierungen von 24, 48 und 72 Stunden	96
<b>Abbildung 46:</b>	Isolierte RNA-Mengen [µg] der Hautmodelle nach 24- und 72- stündiger Behandlung mit Leerformulierungen	97
<b>Abbildung 47:</b>	ΔCT-Werte der Hautmodelle (Leerformulierung) nach 24 und 72 Stunden im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Haut-RNA menschlichen Ursprungs (Hautstandard)	99
<b>Abbildung 48:</b>	Struktur von der Vergleichssubstanz Retinol	101

<b>Abbildung 49:</b>	LDH Freisetzung in das Kulturmedium der Hautmodelle nach einer Applikationsdauer der Vergleichssubstanz von 24, 48 und 72 Stunden	102
<b>Abbildung 50:</b>	Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) in das Kulturmedium nach einer Applikationsdauer der Vergleichssubstanz von 24, 48 und 72 Stunden	102
<b>Abbildung 51:</b>	Aus den Hautmodelle nach 24 und 72 stündiger Applikationsdauer isolierte RNA-Mengen der Vergleichssubstanz Retinol	103
<b>Abbildung 52:</b>	Vergleich der Veränderung der Genexpression von Hautmodellen, nach einer Applikationszeit von 24 und 72 Stunden mit 0,2 % Retinol, zur Leerformulierung, die jeweils auf den Wert 1 gesetzt wird	105
<b>Abbildung 53:</b>	$\Delta$ CT-Vergleich der Hautmodelle (Leerformulierung) mit isolierter menschlicher Haut-RNA nach einer Applikationsdauer von 48 Stunden	107
<b>Abbildung 54:</b>	Freisetzung von Interleukin-8 in das Kulturmedium nach einer Applikationsdauer von 48 Stunden	109
<b>Abbildung 55:</b>	LDH-Freisetzung in das Kulturmedium nach einer Applikationsdauer von 48 Stunden	110
<b>Abbildung 56:</b>	Isolierte RNA-Mengen aus den Hautmodellen nach einer Applikationszeit von 48 Stunden (Tabelle 20)	112
<b>Abbildung 57:</b>	Methodenkontrolle durch Berechnung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte der Marker ARP und $\beta$ -Actin	113
<b>Abbildung 58:</b>	Darstellung der berechneten $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte für Retinol	115
<b>Abbildung 59:</b>	Darstellung der berechneten $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte für <i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> )	116
<b>Abbildung 60:</b>	Darstellung der berechneten $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte für <i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin ( <b>4c</b> )	116
<b>Abbildung 61:</b>	Darstellung der berechneten $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte für Phytosphingosin ( <b>2</b> )	117
<b>Abbildung 62:</b>	Darstellung der berechneten $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte für <i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin ( <b>4d</b> )	117
<b>Abbildung 63:</b>	Darstellung der berechneten $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte der <i>N</i> -Nexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )	118

## Verzeichnis der Tabellen

<b>Tabelle 1:</b>	Zusammenstellung der Lipidzusammensetzung (% m/m) der lebenden Epidermis [Lampe et al. 1983] und von verschiedenen Autoren angegebene Zusammensetzung für die <i>Stratum-corneum-Lipide</i>	4
<b>Tabelle 2:</b>	Rf-Werte, Lösungsmittel und Laufhöhe der jeweiligen Proben nach der DC-Bestimmung	39
<b>Tabelle 3:</b>	Mengenangaben für die Darstellung von <i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )	43
<b>Tabelle 4:</b>	Rf-Werte, Lösungsmittel und Laufhöhe der jeweiligen Proben nach der DC-Bestimmung	44
<b>Tabelle 5:</b>	Übersicht der Konzentrationen der Testsubstanzen und Standards für die zytotoxischen Bestimmungen der Keratinozyten Typ 1 und Keratinozyten Typ 2	46
<b>Tabelle 6:</b>	Übersicht der Konzentrationen der Testsubstanzen für die Chipanalyse	52
<b>Tabelle 7:</b>	Herstellung des cDNA Synthesis Mix (Lagerung bei -20 °C) für die Erststrangsynthese	56
<b>Tabelle 8:</b>	Templat-Zusammensetzung für die PCR, Primer (Tabelle 9 und 10)	57
<b>Tabelle 9:</b>	Verwendete Oligonucleotide der Firma MWG (Forward Primer)	58
<b>Tabelle 10:</b>	Verwendete Oligonucleotide der Firma MWG (Reverse Primer)	58
<b>Tabelle 11:</b>	Übersicht der berechneten log $P_{OW}$ -Werte der Test- und Vergleichssubstanzen	59
<b>Tabelle 12:</b>	Einsatzkonzentrationen der Test- und Vergleichssubstanzen für die Applikationsdauer von einem und vier Tagen auf Keratinozyten für die anschließende DNA-Chipanalyse	78
<b>Tabelle 13:</b>	Isolierte RNA-Mengen [ $\mu$ g] aus den Keratinozyten der Zelllinien H 604, H 614 und H 625 nach einer Applikationszeit von 24 Stunden	87
<b>Tabelle 14:</b>	Isolierte RNA-Mengen [ $\mu$ g] aus den Keratinozyten der Zelllinien H 604, H 614 und H 625 nach einer Applikationszeit von 96 Stunden	89
<b>Tabelle 15:</b>	Marker nach der Auswertung der DNA-Chip-Analyse nach einer Applikationszeit von einem Tag (24 Stunden)	91
<b>Tabelle 16:</b>	Marker nach der Auswertung der DNA-Chip-Analyse nach einer Applikationszeit von vier Tagen (96 Stunden)	92
<b>Tabelle 17:</b>	Isolierte RNA-Mengen aus den mit Leerformulierungen behandelten Hautmodellen, Angaben der total RNA in $\mu$ g/Hautmodell (0,5 cm <sup>2</sup> )	97
<b>Tabelle 18:</b>	Isolierte RNA-Mengen aus den mit Retinol behandelten Hautmodellen, Angaben der total RNA in $\mu$ g/Hautmodell (0,5 cm <sup>2</sup> )	103

<b>Tabelle 19:</b>	Induzierte (I), reprimierte (D) und nicht veränderte (NC) Marker nach der RT-PCR Messung für eine Applikationszeit von 24 und 72 Stunden mit der Vergleichssubstanz Retinol	105
<b>Tabelle 20:</b>	Isolierte total-RNA Mengen aus den Hautmodellen nach einer Applikationszeit von 48 Stunden, Angaben der total RNA in $\mu\text{g}/\text{Hautmodell}$ ( $0,5\text{ cm}^2$ )	111
<b>Tabelle 21:</b>	Gegenüberstellung der Mittelwerte ( $n = 3$ ) der total RNA [ $\mu\text{g}$ ] nach 24, 48 und 72 Stunden Applikationsdauer	111
<b>Tabelle 22:</b>	Induzierte und reprimierte Marker der Testsubstanzen nach einer Applikationszeit von 48 Stunden	114





# 1 Einleitung und Zielsetzung

Für alle auf dem Land lebenden Säugetiere einschließlich des menschlichen Organismus ist die Haut ein essentielles Organ. Des Weiteren dient die Haut als Sinnesorgan und spielt bei der Wärmeregulation des Körpers eine wesentliche Rolle. Ihre Bedeutung liegt in ihrer Schutz- und Barrierefunktion begründet. Es ist seit Jahren bekannt, dass das *Stratum corneum*, die äußerste Schicht der Epidermis, von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut ist. Durch die im Säugetierorganismus einzigartige Struktur des *Stratum corneum*, in dem verhornte Hautzellen (Corneozyten) in einer Lipidmatrix aus multiplen lamellaren Lipidschichten eingebettet sind, wird der effektive Schutz gegenüber exogenen Noxen sowie eine Minimierung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) ermöglicht (Schurer et al., 1991).

Die Zusammensetzung der Lipidmatrix des *Stratum corneum*, die von einer komplexen Mischung verschiedener Ceramide, freier Fettsäuren, Cholesterol und Cholesterolderivate bestimmt wird, ist in unserem Organismus einmalig [Bouwstra et al., 2000]. Die extrazellulären Lipide stammen von intrazellulären Zellorganellen, den *lamellar bodies*, die im *Stratum granulosum*, einer Schicht unter dem *Stratum corneum* zu finden sind. Lipide stellen bedeutende Naturstoffe dar, die in jedem Organismus vorkommen und vielfältige Funktionen erfüllen. Sie rücken auf Grund dessen vermehrt in den Mittelpunkt der heutigen Forschung. Ceramide gehören zu der Gruppe der Sphingolipide und sind hauptsächlich dafür bekannt, dass sie der Signaltransduktion dienen. Im *Stratum corneum*, der äußeren Schicht der menschlichen Haut, sind sie unerlässlich und tragen dort maßgeblich zum Schutz des Körpers vor äußeren Schädigungen und zur Verhinderung von unkontrolliertem Wasserverlust bei.

Die *Stratum corneum*-Ceramide zeichnen sich durch ihre komplexe, einzigartige und nicht in anderen Körpergeweben anzutreffende Zusammensetzung aus, die auf vielfältigen Strukturelementen und deren Kombinationen beruht [Bouwstra et al., 2002].

Zielsetzung in dieser Arbeit ist es, neue kosmetische Wirkstoffe, basierend auf der Sphingoidbase Phytosphingosin, zu synthetisieren und ihre Wirksamkeit zu untersuchen. Die physiko-chemischen Parameter dieser Derivate werden im Vorfeld theoretisch betrachtet, und der Einfluss der Substanzen auf die physiologischen und molekulargenetischen Parameter

mittels Modellen untersucht. Als Testmethoden werden zwei verschiedenartige experimentelle Ansätze gewählt: die DNA-Chiptechnologie und die RT-PCR-Methode.

Die Sphingolipidderivate werden in basalen Modellen (menschliche Keratinozyten) in zwei unterschiedlichen Zeiträumen eingebracht, um unter anderem deren zytotoxisches Potential für die Folgeuntersuchungen mittels DNA-Chip-Analyse bewerten zu können. Durch mikroskopische Methoden werden die Morphologien der Zellen ausgewertet und mit ihren aus den Keratinozyten isolierten total-RNA-Mengen zu unterschiedlichen Zeitpunkten korreliert. Durch die DNA-Chiptechnologie werden die zellulären RNA-Moleküle getrennt, geordnet und quantifiziert. Aus dem Vergleich der Expressionsstärke unter verschiedenen Bedingungen werden Aussagen zur Wirksamkeit der synthetisierten Verbindungen abgeleitet.

Die beobachteten Effekte der Sphingolipidderivate bei der DNA-Analyse werden in komplexen physiologischen Modellen (Hautmodelle) überprüft. Diese Methode berücksichtigt sowohl die topische Applikation der Wirkstoffe, als auch die Barrierefunktion der Epidermis. Hierfür werden die basalen Systemparameter analysiert und das Testsystem angepasst, optimiert und validiert. Die Genexpression, die durch die Sphingoidbasen-Derivate in den Hautmodellen hervorgerufen wird, wird mittels RT-PCR ermittelt. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR sollen Veränderungen in der Expressionsstärke von ausgewählten Zielgenen analysiert werden. Als Ergänzung zur vorgenannten Fragestellung sollen die Ergebnisse der DNA Chip- und RT-PCR-Methode auf ihre Korrelierbarkeit untersucht werden.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Ceramide und ihre Aufgaben in der Haut

Ceramide und andere Sphingolipide sind als antiproliferative, differenzierungsfördernde Substanzen beschrieben und spielen als sogenannte Botenstoffe („*second messenger*“) eine besonders wichtige Rolle [Mimeault et al., 2004]. In lebenden, gesunden Hautzellen sind Ceramide (CER), Phosphatidylcholin (PC), Diglyceride (DG), Sphingomyeline (SM), Sphingosin (SO), Sphingosin-1-phosphat (SPP) und Fettsäuren (FS) in einem Gleichgewichtszustand (Homöostase). Mit fortschreitender Differenzierung der Keratinozyten zum *Stratum corneum* nimmt der Gehalt an Ceramiden und Glucosylceramiden zu, die gegenüber der Außenwelt eine ausgeprägte Schutzfunktion übernehmen.

### 2.2 Sphingolipide im Stratum corneum

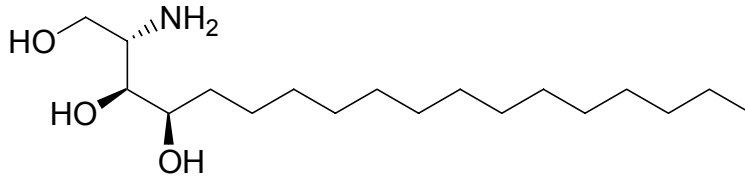
Die ersten wissenschaftlichen Informationen zu den Hautlipiden wurden 1853 von Homalle publiziert [Homalle, 1853]. Er fand heraus, dass die unterschiedlichen Hautschichten nicht alle gleich permeabel sind. Im Jahre 1874 beschrieb Thudichum eine „neue“ Klasse der Lipide, welche er „Sphingolipide“ nannte, nach der Sphinx, jenem Monster der griechischen Sage, halb Frau, halb geflügelter Löwe, die jeden verschlang, der ihre Rätsel nicht zu lösen vermochte [Thudichum, 1874].

Mit 18-50 % bilden die Sphingolipide den größten Anteil der *Stratum corneum*-Lipide (Tabelle 1, die Angaben zur Lipidzusammensetzung sind aus der Dissertation von Glombitza, 2001, übernommen).

**Tabelle 1:** Zusammenstellung der Lipidzusammensetzung (% m/m) der lebenden Epidermis [Lampe et al. 1983] und von verschiedenen Autoren angegebene Zusammensetzung für die *Stratum-corneum-Lipide*

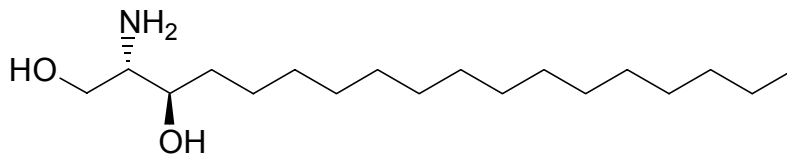
Lipidklasse	<i>Stratum basale</i>	<i>Stratum granulosum</i>	<i>Stratum corneum</i> [Lampe 1983] [Elias 1990] [Wertz 1996]		
Polare Lipde					
Phospholipide	44,5	25,3	4,9	Spuren	-
Cholesterolsulfat	2,4	5,5	1,5	4,0	-
Neutrale Lipide					
Cholesterol	11,2	11,5	14,0	20,0	25,0
Freie Fettsäuren	7,0	9,2	19,3	25,0	10,0-15,0
Triglyceride	12,4	24,7	25,2	Spuren	Spuren
Sterole und Wachsester	5,3	4,7	5,4	5,0	5,0
Squalen	4,9	4,6	4,8	4,0	-
<i>n</i> - Alkane	3,9	3,8	6,1	4,0	-
Sphingolipide					
Glucosylceramide	3,5	5,8	Spuren	-	-
Ceramide	3,8	11,7	18,1	35,0	50,0

Diese leiten sich vom *D-Erythro*-Phytosphingosin (2S,3S,4R)-2-amino-octadecan-1,3,4-triol (I), *D-Erythro*-Sphinganine (2S,3R)-2-amino-octadecan-1,3-diol (II) bzw. vom *D-Erythro*-Sphingosin (2S,3R,4E)-2-amino-octadec-4-en-1,3-diol (III) als langkettige Base ab und sind amidartig an eine Fettsäure gebunden.



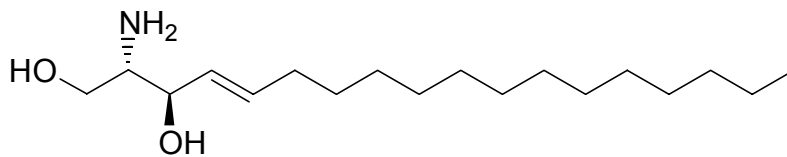
I

Phytosphingosin



II

Sphinganine



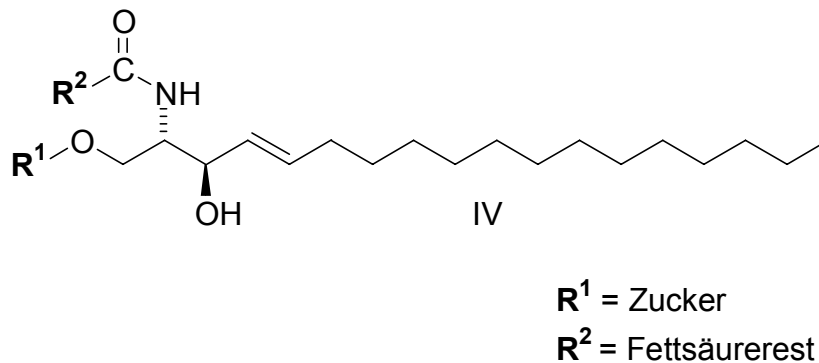
III

Sphingosin

**Abbildung 1:** Struktur der im *Stratum corneum* vorkommenden Sphingolipidbasen

Durch Verknüpfung der primären OH-Gruppe mit einem Glucose-Molekül entstehen Glucosylceramide (Cerebroside, IV), die bevorzugt in den unteren Epidermisschichten als Bestandteile der Lamellengranula auftreten (Abbildung 2). Der besondere Bestandteil der Glucosylceramide ist das Glucosylamid A oder auch Acylglucosylceramid genannt. Es besteht aus einer langkettigen  $\omega$ -Hydroxyfettsäure in Amidbindung mit einer Sphingoidbase, wobei die OH-Gruppe der  $\omega$ -Hydroxyfettsäure wiederum mit einer Fettsäure, der ungesättigten Linolsäure, verknüpft ist. Die  $\omega$ -Hydroxyfettsäure ist mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 30 bis 34 C-Atomen fast zweimal so lang wie die üblich vorkommenden Fettsäuren der membranbildenden Phospholipide. Die Anwesenheit des Acylglucosylceramids führt zur Abflachung und Stapelung der lamellaren Vesikel in den Lamellengranula [Wertz und Downing, 1982]. Neben den Glucosylceramiden gibt es noch

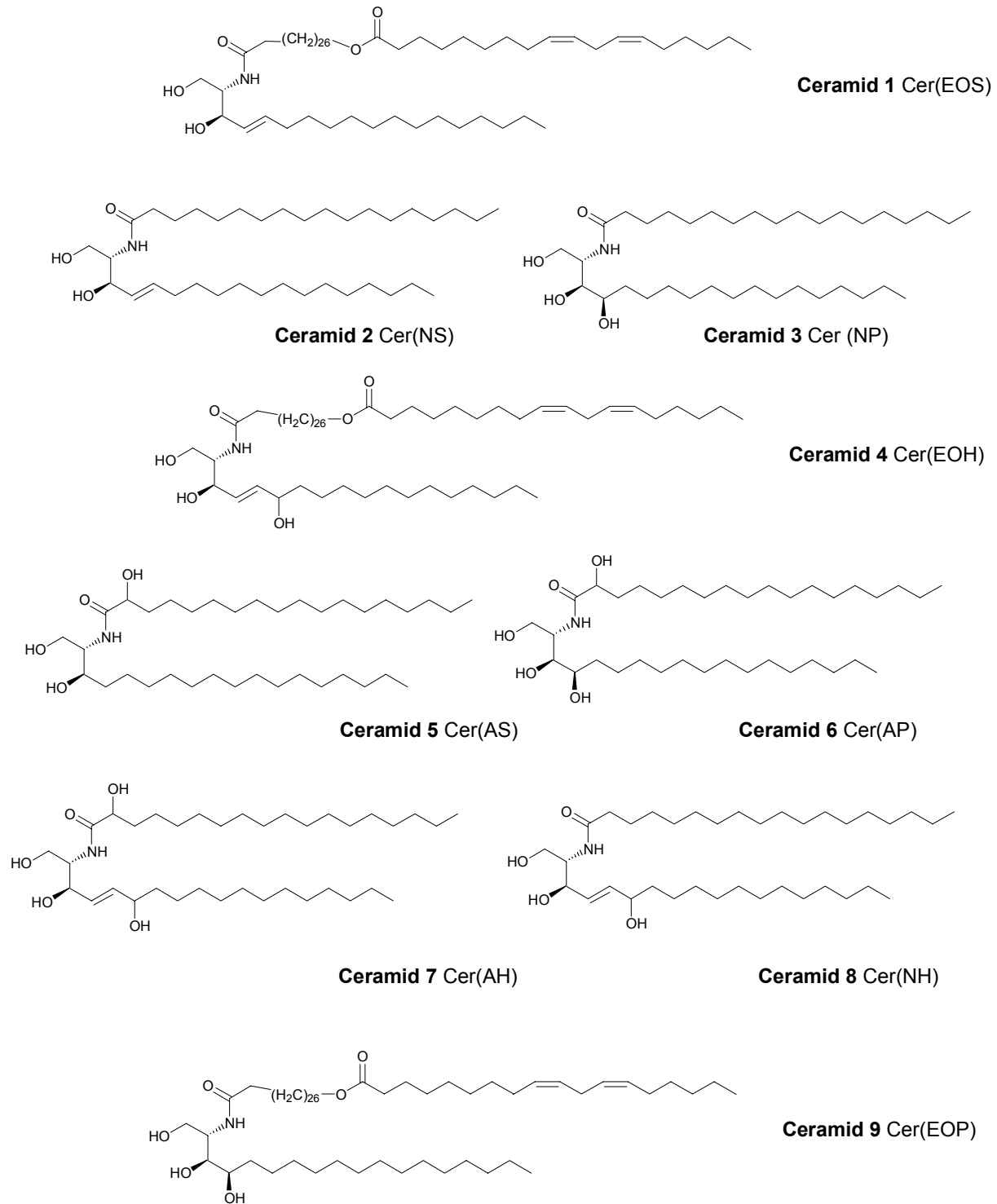
eine Reihe weiterer Sphingolipidderivate z.B. die Lactosylceramide, die als Zuckerrest Di-, Tri- oder Tetrasaccharide als Baustein beinhalten.



**Abbildung 2:**      Struktur der Sphingolipide

Weiterhin wird für dieses Molekül eine mögliche Rolle als Precursor bei der Bildung der kovalent gebundenen Lipide des cornified envelope diskutiert [Wertz et al., 1989a]. Aus den Glucosylamiden entstehen nach Exozytose der Lamellengranula die Ceramide unter Einwirkung von extrazellulären Enzymen. Zusätzlich zu den bereits genannten Lipiden findet man im *Stratum corneum*  $\omega$ -Hydroxyceramide, die die Außenseite des cornified envelope in Form einer Monolayer umhüllen [Wertz und Downing, 1987]. Dabei werden diese über eine Esterbindung des Proteinanteils des cornified envelope sowohl zur Hälfte mit der  $\omega$ -Hydroxylgruppe der Fettsäure als auch mit einer Hydroxylfunktion des Sphingosins kovalent gebunden [Wertz et al., 1989b]. Durch Radiomarkierungsstudien konnte die Herkunft dieses Hydroxyceramids als Abbauprodukt des Acylglucosylceramides belegt werden [Hedberg et al., 1988]. Im Gegensatz zu den anderen Lipiden des *Stratum corneums* sind die Lipide des cornified envelope durch organische Lösungsmittel nicht extrahierbar.

Die *Stratum corneum*-Ceramide stellen eine sehr heterogene Mischung dar, die aus mindestens neun verschiedenen Klassen bestehen, die sich zum einen durch die verschiedenen Sphingosinbasen und zum anderen durch die Art der mit der Kopfgruppe des Sphingosinderivates verknüpften Fettsäure unterscheiden. Die Abbildung 3 zeigt repräsentative Strukturen der Ceramide im *Stratum corneum*, wobei diese nach ihrer Polarität angeordnet sind [Ponec, 2003].



**Abbildung 3:** Struktur der im humanen *Stratum corneum* vorkommenden Ceramide [Ponec, 2003]. Die Bezeichnungen der Ceramide in Klammern folgt der Nomenklatur nach Motta et al., 1993

Rieger [1996] berechnete beispielhaft, dass allein die Ceramid-2-Gruppe durch eine Kombination verschiedener langkettiger Sphingosinbasen und Fettsäuren aus einer Mischung

von 250 unterschiedlichen Komponenten bestehen kann, und machte so die große Variabilität der Gruppe der Ceramide deutlich.

In der Literatur sind Wirkweisen beschrieben, in denen die Ceramide in der Lage sind Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder AP-2 (AP = Aktivator Protein) zu aktivieren und Wachstumsprozesse zu regulieren [Grether-Beck et al., 2005].

Es konnte gezeigt werden, dass bei verschiedenen Formen der Ichthyose ein Mangel an bestimmten Acylceramidfraktionen zu erkennen ist [Paige et al., 1994]. Zusätzlich wurde eine Veränderung in der Verteilung der Ceramide bei psoriatischen Patienten beobachtet [Motta et al., 1994]. Berardesca et al. untersuchten in einer Studie an 580 Probanden die Effizienz lokaler Hautlipidmischungen. Die Ergebnisse der Studie belegen, dass eine optimierte Lipidmischung hilfreich bei der Regeneration der hauteigenen Barrierefunktion ist. Darüber hinaus zeigen sie, dass auch bei krankhaften Hautbildern (Dermatose) eine Verbesserung des Hautbildes gefördert wird [Berardesca et al., 2001]. Des Weiteren führt eine Entfernung der Hautlipide durch Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln ebenfalls zu einer Erhöhung der Permeabilität des *Stratum corneum* mit einem deutlichen Anstieg des TEWL [Smith et al., 1982]. Durch diese und zahlreiche andere Untersuchungen wurde die Bedeutung der interzellulären Lipide für die Barriereigenschaften der Haut eindeutig belegt.

Mit zunehmendem Alter, bei bestimmten Erkrankungen oder als Folge von Umwelteinflüssen schwindet der Gehalt an Lipiden in den Membranschichten des *Stratum corneum*. Es konnte gezeigt werden, dass die Haut von 50-jährigen Frauen nur noch halb so viele Ceramide enthält wie die von 20-jährigen [Dietz et al., 2002]. So ist anzunehmen, dass die Keratinocyten mit steigendem Alter einen Teil ihrer Fähigkeit einbüßen, bestimmte Arten von Ceramiden zu produzieren – speziell diejenigen, die auf Phytosphingosin basieren.

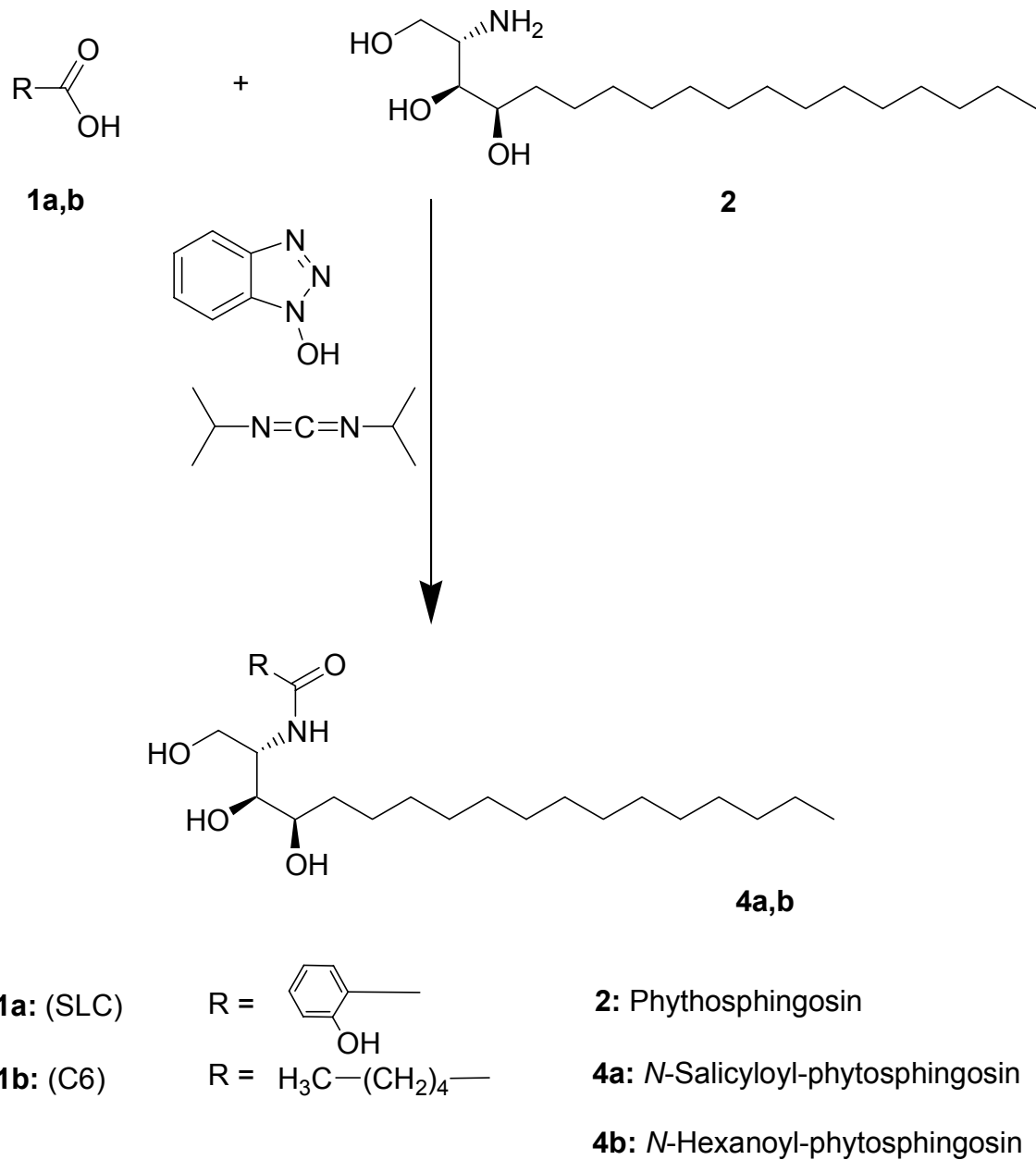
In der Kosmetik werden bereits Ceramid-enthaltende Formulierungen angeboten, um der Haut Ceramide von außen zuzuführen. In dieser Arbeit sollen neuartige Verbindungen ausgehend vom Phytosphingosin mit unterschiedlichen Carbonsäuren hergestellt und auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Die eingesetzte Sphingoidbase wird mittels Fermentation z.B. mit dem Hefestamm *Pichia ciferi* hergestellt. Mit drei optisch aktiven Kohlenstoffatomen am Phytosphingosin gibt es theoretisch acht Stereoisomere. In der menschlichen Haut kommt nur eines davon vor – das gleiche, das die Hefe im Bioreaktor produziert. Chemische Herstellungsprozesse der Sphingoidbase dagegen liefern bisher ein Gemisch aller acht Varianten [Dietz, 2002].



An der Oberfläche der Haut haben topisch applizierte Ceramide, wie z.B. Phytosphingosin oder Cermaid III, eine gute Pflegewirkung. Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, sind Ceramide als antiproliferative, differenzierungsfördernde Substanzen bekannt und spielen als sogenannte Botenstoffe („*second messenger*“) eine besonders wichtige Rolle. Ceramide entfalten in der Epidermis ihre Wirkungen entweder als intrazelluläre Botenstoffe oder extrazellulär als die Hautbarriere bildende Lipide, deren gemeinsame intrazelluläre Herkunft durch die *de-novo*-Synthese (Biosynthese der Ceramide) angenommen wird [Geilen et al., 1997]. Zahlreiche andere Studien verdeutlichen die fundamentale Rolle der Ceramide in der Hautbarrierefunktion [Beradesca et al. 2001, Kucharekova et al. 2002, De Paepe et al. 2002, Chamlin et al. 2002]. Demzufolge ist die Entwicklung ceramidhaltiger Formulierungen in der Kosmetik und der Dermatologie von großer Bedeutung.

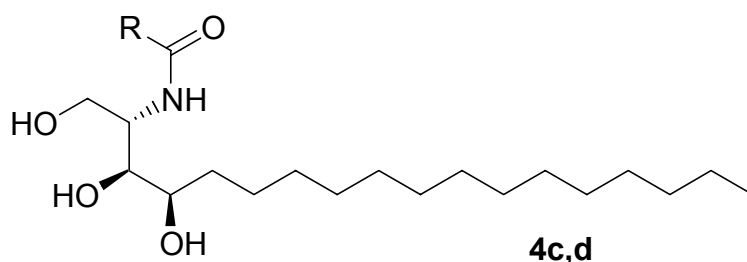
## 2.3 Synthesekonzept neuer Wirkstoffe

Die Synthese der neuen Verbindungen wird ausgehend von Carbonsäuren (**1a,b**) und dem Phytosphingosin (**2**) mit Diisopropylcarbodiimid durchgeführt (Abbildung 4). Die Kupplung findet in Anwesenheit von 1-Hydroxybenzotriazol als Katalysator statt. Die Verbindungen **4a** und **4b** werden in 66%iger (**4a**) bzw. 58%iger (**4b**) Ausbeute erhalten. Die analytischen Daten befinden sich im Kapitel 3.1.



**Abbildung 4:**      Synthese der Sphingolipide (**4a,b**)

Für die nachfolgenden Untersuchungen werden die Verbindungen **4c** (Cosmoform B.V., Degussa Delft) und **4d** (Avanti Polar Lipids) kommerziell erworben.



**1c:** (C18)      R =  $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{16}-$       **4c:** *N*-Stearoyl-phytosphingosin

**1d:** (C2)      R =  $\text{H}_3\text{C}-$       **4d:** *N*-Acetyl-phytosphingosin

**Abbildung 5:** Kommerziell erworbene Verbindungen (**4c,d**)

## 2.4 Wirkstoffprüfung

Die häufigsten Wirksamkeitsprüfungen von neuen kosmetischen Inhaltsstoffen wurden in der Vergangenheit mittels Tierversuchen durchgeführt. Mittlerweile sind in einigen Bereichen keine Tierversuche mehr erlaubt, da u.a. die gesetzlichen Vorgaben in Europa ab September 2009 ein Verbot von Tierversuchen für Kosmetikinhaltstoffe innerhalb der EU vorsehen (7. Änderung der Kosmetikrichtlinie 2003/15/EG). In den letzten Jahren wurden Systeme entwickelt, um Tierversuche zu ersetzen.

Standardisierte, validierte und damit allgemein akzeptierte *in-vitro*-Methoden sind unumgänglich zur Charakterisierung von neuartigen Wirkstoffen hinsichtlich Penetration und Wirkverhalten. Während bei festen oralen Zubereitungen oder pharmakologischen Wirkstoffen derartige Modellsysteme existieren, befinden sich Modellsysteme für dermatopharmazeutische oder kosmetische Formulierungen noch im Stadium der Entwicklung bzw. Standardisierung. In der Literatur der letzten Jahre lassen sich jedoch Trends erkennen, die eine Einteilung der Freisetzungs- und Penetrationsmodellsysteme erlauben. Zur Nachbildung der Penetration werden Modellsysteme mit künstlichen und biologischen Membranen eingesetzt. Außer an künstlichen Hautmodellen werden derartige Wirkstoffuntersuchungen

direkt an menschlicher Haut, an Zellkulturen, an Operationsmaterial von menschlicher Haut bzw. an Zellen und Bakterien durchgeführt [Spielmann et al., 1994].

Die Haut besitzt entsprechend ihren Aufgaben einen komplexen Aufbau und eine Vielzahl von Zelltypen. Bei der Prüfung von Substanzen sind jedoch validierte und standardisierte Modelle von Vorteil. Daher sind Einzellsysteme verbreitet, die mit Standardgewebekulturtechniken erhalten werden. In erster Linie mangelt es diesen Systemen an charakteristischen Eigenschaften intakter Haut und an Interaktionen unterschiedlicher Zellen. Eine prinzipielle Korrelation zwischen der Zytotoxizität topisch applizierter Pharmaka *in vitro* und lokalen Irritationen *in vivo* konnte nachgewiesen werden.

Aus der Bedeutung einzelner Zelltypen für die Epidermisfunktion resultiert die bevorzugte Verwendung von Keratinozytenkulturen für das Studium der Hautverträglichkeit. In Abhängigkeit vom Ursprung des biologischen Materials und von den Kulturbedingungen sind Keratinozytenrein- und -mischkulturen etabliert.

Für die Bewertung der Hautverträglichkeit nach Einsatz epidermaler *in-vitro*-Zellsysteme sind in Abhängigkeit vom spezifischen Problem eine Reihe standardisierter, reproduzierbarer Methoden und Parameter verbreitet. Beurteilt werden die nachfolgenden Einflüsse:

- Zellmorphologie
- Zellproliferation
- Zelldifferenzierung
- Zellvitalität
- Zellmembranintegrität.

In der klinischen Beurteilung der lokalen Verträglichkeit von Substanzen bzw. Arzneistoffen werden hinsichtlich der auftretenden Nebenwirkungen mehrere Formen von Hautreaktionen unterschieden, die auf völlig unterschiedlichen Mechanismen beruhen:

- irritative Reaktion
- Sensibilisierung
- phototoxische und photoallergische Reaktion
- pharmakologische Nebenwirkungen.

## 2.5 Methoden zur Wirksamkeitsprüfung

Neue wissenschaftliche Methoden der Biologie und Medizin sind auch für die Kosmetikforschung interessant. Um kosmetische Wirkstoffe auf den Markt zu bringen, müssen deren Wirkungen, Nebenwirkungen und mögliche toxische Eigenschaften bestimmt werden [Spielmann, 2004]. Um diese Wirksamkeiten von kosmetischen Wirkstoffen abzuschätzen, können regulatorische Vorgänge wie u.a. die Differenzierung und das Zusammenspiel einzelner Proteine in der Haut untersucht werden

### 2.5.1 Aufbau und Differenzierungsprozess der Epidermis

Beschreitet eine Zelle den Weg der terminalen Differenzierung, so entfernt sie sich aus der Basalschicht [Paus et al., 1995; Polakowska et al., 1994]. Die *Basalmembran*, bestehend aus drei funktionell unterschiedlichen Schichten, dient den Keratinozyten als strukturelle Grundlage und verbindet die zellreichen Schichten der Epidermis ohne Zwischengewebe mit der zellarmen, aber an Zwischengewebe reichen Dermis. Funktionelle Veränderungen der Basalmembran können einerseits zur Migration der Keratinozyten, verbunden mit der Freisetzung proteolytischer Enzyme führen, oder aber die epidermodermale Kommunikation quer durch die Basalmembran stören. Im normalen Alterungsprozess, jedoch unter Sonnenlichteinfluss schon vorzeitig bereits im Alter ab 20-30 Jahren, tritt neben Strukturbrüchen und Abflachung der Epidermis auch fokale Membranverdoppelung auf, die zu Faltenbildung und anderen sichtbaren Zeichen des vorzeitigen Alterns führen. Dadurch werden in Keratinozyten und Fibroblasten der Dermis gleichermaßen Reparaturprozesse induziert.

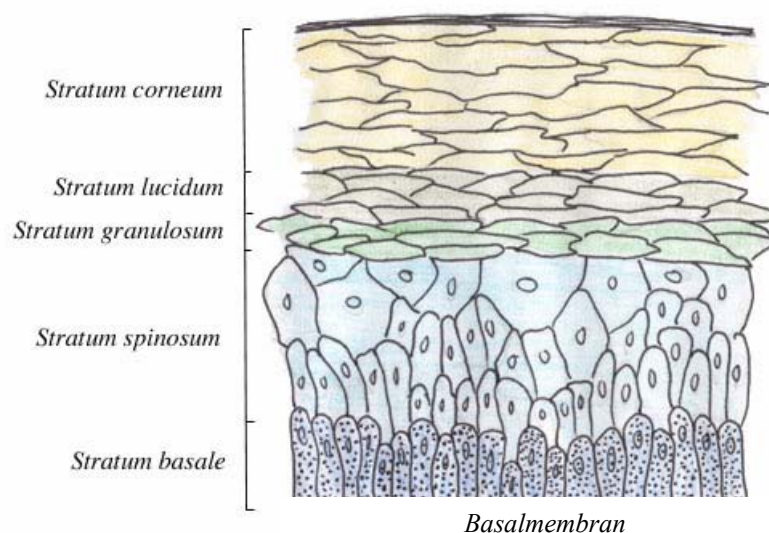
Die *Basallamina* ist eine feine Schicht, bestehend aus Epithelzellen sezernierten Glykoproteinen. Die darunter liegende *Lamina reticularis* ist eine Schicht aus Bindegewebezellen sezerniertem extrazellulären Material. Die *Lamina reticularis* besteht aus Kollagenfasern, auch retikuläre Fasern, genannt. Die Familie der Kollagene stellt eine Gruppe extrazellulärer Proteine mit den meisten Vertretern dar. Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Eiweiß in unserem Körper, dessen Abbau die Ursache für die Hautalterung ist. Der Kollagen Typ VII hat z.B. die Aufgabe, als netzbildendes Kollagen zu fungieren. Dieser Typ bildet Dimere, die sich zu Verankerungsfibrillen verbinden und dazu beitragen, die Basalmembran vielschichtiger Epithelien in der Haut mit dem Bindegewebe zu verknüpfen [Vannahme, 2000]. Kollagen, das normalerweise das Bindegewebe elastisch hält, wird von den Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die eine große Bedeutung bei den Umbauvorgängen

des Bindegewebes haben, abgebaut [Thibodeau, 2005]. Ohne Kollagen wird die Hauterneuerung empfindlich gestört. Zwischen dem 20. und 80. Lebensjahr nimmt der Kollagengehalt der Haut durch enzymatische Degradation u.a. durch die Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP 1) um circa 65 % ab. Hierdurch verringert sich gleichzeitig die Dicke der Dermis pro Dekade um etwa 6 %. Eine Produktion oder Zufuhr von neuem Kollagen, die Verzögerung des eigenen Kollagenabbaus oder die Stimulation der hauteigenen Kollagenproduktion, sowie die Hemmung des Abbaus der extrazellulären Matrix sind Möglichkeiten, die intrinsischen Alterungsprozesse zu beeinflussen. Die MMPs werden aufgrund ihrer Substanzspezifität bzw. ihres Aufbaus aus verschiedenen Domänen in vier Untergruppen: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membranständige MMPs unterteilt. Die Substanzspezifität der Kollagenase MMP 1 bezieht sich auf das Kollagen III > I, II, VII, VIII, X, Aggrekan und  $\alpha_2$ -Makroglobulin.

Zusätzlich sind in den Zellen intermediäre Filamente, die Keratine, enthalten [Candi et al., 2005]. Es handelt sich dabei um bewegliche Filamente, helikale Polypeptide, die die Haut insbesondere gegen Schereinwirkungen stabilisieren.

Angrenzend an die Basalmembran schließt das *Stratum basale* an (Abbildung 6). Die unterste Schicht der Epidermis besteht aus einer Einzellage kubischer Zellen und dient als einlagige innerste Zellschicht der Regeneration der Haut. Es ist die Proliferationszone, der teilungsaktive Bestandteil der Epidermis. Durch mitotische Zellteilung gehen aus ihnen die Zellen der anderen Schichten hervor. Als Markerprotein ist das Keratin 5 zu nennen, es gehört zur Klasse der weichen Epithelien und dort zu den basischen Keratinen. Keratine zeigen bei der Polymerisation zu Intermediärfilamenten eine Besonderheit, da sie aus strukturellen Gründen beim ersten Polymerisationsschritt nur heteropolymere Keratinintermediärfilamente bilden, die aus je einem Vertreter beider Subklassen (Typ I und Typ II) bestehen. Im Zuge der anschließenden Reifung vollzieht sich im *Stratum Spinosum* (Abbildung 6), welches den Hauptdickenanteil der Epidermis ausmacht, eine Zunahme an plasmatischen Volumen und der Anzahl der Organellen. Im weiteren Verlauf dieser Entwicklung beginnen die Zellen mit der Exprimierung von Intermediärfilamentproteinen. Mit dem Beginn der Synthese von Profilaggrin und Involucrin beginnt ein weiterer Schritt zur Ausdifferenzierung der Keratinozyten [Ishidai-Yamamoto et al., 1997]. Bedingt durch die desmosomale Verbindung der einzelnen Zellen erhalten diese eine stachelartige Form (Stachelzellen). Über dem *Stratum spinosum* schließt das *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht) (Abbildung 6) an und wird von den Keratinozyten während ihrer transepithelialen Wanderung nach durchschnittlich 10-14 Tagen erreicht. Die Differenzierung schreitet mit der Bildung der Keratohyalin granula fort.

Die Zellen verhornen und sind in Stapeln übereinander gelagert, erscheinen groß und stark abgeflacht, bevor sie absterben und in das *Stratum corneum* übergehen. Im *Stratum granulosum* werden viele lipidhaltige Granula, sogenannte Odland-Bodies gebildet, die im Zuge der Differenzierung zu Corneozyten auch zum Aufbau der extrazellulären Matrix beitragen. Mit fortschreitender Verhornung beginnt in dieser "Körnerzellschicht" bereits der Umbau der Zellen, sie wandeln sich allmählich in leblose Keratinozyten um [Gandarillas et al., 1999]. Die äußere Form plattet sich allmählich ab und das Zellinnere wird mehr und mehr von Keratingranula dominiert. Hier erfolgt die Umwandlung der Vorstufe des Profilaggrins in das Filaggrin, welches an der Verdichtung und Vernetzung von Keratin beteiligt ist [Fritsch, 1990]. Die Keratinozyten verhornen dabei zu stoffwechselinaktiven Corneozyten, bei denen gleichzeitig die Zellorganellen durch lysosomale Enzyme aufgelöst werden. Weiterhin wird der Inhalt der Odland-Bodies durch Exozytose in den Interzellularraum freigesetzt und bildet dort eine kontinuierliche Lipidmatrix aus [Landmann, 1991].



**Abbildung 6:** Schematischer Aufbau der Epidermis, [anne\_rats, 2006]

Der Übergang vom *Stratum granulosum* über das *Stratum lucidum* zum *Stratum corneum* (Abbildung 6) vollzieht sich durch die membrangebundene Transglutaminase Typ I, die für die Bildung des *Cornified envelopes* zuständig ist. In der Endphase der Differenzierung vernetzt sie kovalent Proteine wie Loricrin, Keratine und Involucrin unterhalb der Plasmamembran miteinander und bewirkt darüber hinaus die Quervernetzung und Verknüpfung von Involucrin mit  $\omega$ -Hydroxy-ceramiden und kovalente Verknüpfung von Protein und Lipidmatrix [Watt und Phil, 1983]. Schließlich wird, ausgelöst durch spezifische Faktoren, der lebende Keratinozyt zum toten Corneozyten transformiert und dieser in die Lipidmatrix des *Stratum corneum* eingebettet. Mit diesem Prozess einhergehend vollzieht sich

der Übergang von der keratinozytären Membran zum cornified envelope der Corneozyten. Diese kompakte Membran ist aus den Hüllproteinen Cystatin A, Loricrin, Involucrin, Elafin und kleineren, an prolinreichen Proteinen zusammengesetzt [Steinert und Marekow, 1995]. In diesem Netzwerk sind wiederum die Keratinfilamente der Corneozyten eingebunden, die ebenfalls im Zellinneren durch Filaggrin aneinander geknüpft werden. Die Dauer der Entwicklung der Corneozyten umfasst ca. 30 Tage.

Die Differenzierung der Keratinozyten wird durch Liganden und Rezeptoren gesteuert. Nach der Bindung von Liganden (häufig Lipidmetabolite) bindet der Komplex aus Ligand und Rezeptor an definierte regulatorische Sequenzen in der DNA und beeinflusst die Transkription von Genen insbesondere der Zelldifferenzierung, des Energie- und des Lipidstoffwechsels. Zu den Rezeptoren zählen unter anderem die Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptors (PPAR) sowie der Retinoic-Acid- (RAR) und Retinoid-X- (RXR) Rezeptor.

An der Zellproliferation und der -differenzierung sind die Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptors beteiligt, von denen bisher drei Subtypen in Keratinozyten identifiziert worden sind: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  [Kuenzli, 2003]. In der menschlichen Epidermis ist PPAR $\beta/\delta$  der häufigste PPAR-Typ, wohingegen PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  in den tieferen Schichten lokalisiert sind. Während nach der Differenzierung der menschlichen Keratinozyten in *ex-vivo*-Versuchen der Gehalt an PPAR $\beta/\delta$ -Expression gleich bleibt, konnte bei den PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  ein Anstieg im Verlauf der Differenzierung festgestellt werden [Kuenzli, 2003].

Bei den nukleären Retinoid-Rezeptoren gibt es zwei Familien: Die Retinsäure-Rezeptoren (Retinoic-Acid-Receptors, RAR) und die Retinoid-X-Rezeptoren (Retinoic-X-Receptors RXR), die jeweils in drei Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$ ) vorkommen. Sie werden vorwiegend in der Haut in Form von Dimeren, Homodimeren und Heterodimeren exprimiert. RAR- $\alpha$  kommt in der Epidermis nur im *Stratum germinativum* (Regenerations- bzw. Keimschicht der Haut, bestehend aus dem *Stratum basale* und dem darüber gelegenen *Stratum spinosum*) vor. RAR- $\beta$  findet sich hauptsächlich in der Dermis, wird aber auch in anderen Körpergeweben exprimiert. RAR- $\gamma$  wird vorwiegend in der Epidermis gefunden. RAR- $\alpha$  wird mit Proliferation der Keratinozyten und RAR- $\gamma$  mit terminaler Differenzierung der Keratinozyten in Verbindung gebracht [Jansen et al., 2005]. Die Retinoidrezeptoren zeigen unterschiedliche Affinitäten für die verschiedenen Retinoide, so zeigt z.B. RAR eine hohe Affinität für all-*trans*-Retinsäure und RXR für die 9-*cis*-Retinsäure. Der Retinsäure-Rezeptor-Komplex aktiviert Gene mit einem Retinsäure-Response-Element (RARE) im Promotorbereich, was die



Transkription (mRNS-Synthese) dieser Gene und die Translation (Proteinsynthese) auslöst und somit zur Retinoidwirkung auf Proteinebene führt. Zusätzlich sei hier noch die Familie der Transkriptionsfaktoren AP-1, SP-1 und AP-2 genannt. Sie sind ebenfalls an der Proliferation sowie der Differenzierung in der menschlichen Haut beteiligt [Fuchs und Raghavan, 2001]. AP-1 wird eine wesentliche Bedeutung in Hinblick auf Zellwachstum und Zellproliferation zugesprochen. Dies stellt einen weiteren Signaltransduktionsweg dar, über den Wirkstoffe indirekt zelluläre Funktionen auf Rezeptorebene beeinflussen können [Jansen, 2005].

Des Weiteren seien hier die Proteine Aquaporin, Zytokin und das Skalp zu nennen. Aquaporine (AQP) sind Proteine, die Kanäle in der Zellmembran bilden, um den Durchtritt von Wassermolekülen zu erleichtern (Membrantransport) [Beitz und Schultz, 1999]. Sie sind ubiquitär, treten also bei Bakterien, Tieren, Säugetieren und Pflanzen auf. Da Biomembranen in ihrem Inneren hydrophob sind, ist die Passage von Wassermolekülen erschwert. Die Wasserleitfähigkeit eines Kanals beträgt dagegen bis zu 3 Milliarden Moleküle pro Sekunde. Auf Grund des Engpasses in der Mitte des Kanals können keine größeren Teilchen als Wassermoleküle den Kanal passieren. Da mit dem Wasser aber Protonen weitergeleitet und dadurch der lebenswichtige Protonengradient zerstört werden würde, müssen die Kanäle verhindern, dass diese Ionen durchgeschleust werden. Der Protonengradient wird genutzt, um die Energie für aufwändige Transportvorgänge zu erzeugen. Die hohe Effizienz der Aquaporine liegt darin begründet, dass sie die Wassermoleküle einzeln und geordnet durch den Kanal leiten und dabei die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Wassermolekülen zeitweise lösen. Sie sind wichtig für die Erhaltung der Wasserhomöostase in der lebenden Schicht der Epidermis.

Zytokine sind Botenstoffe, die von Immunzellen gebildet werden, um mit anderen Zellen des Immunsystems zu kommunizieren und die komplizierten Abwehrreaktionen regulieren zu können [Rieger et al., 2001]. Von ihnen sind heute ungefähr 50 verschiedene Stoffe bekannt. Gleichzeitig locken Zytokine Immunzellen an und verstärken so eine Immunreaktion. Als Zytokine sind besonders zu nennen:

- **Interleukine:** zur Förderung der Vermehrung bzw. Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, Aktivierung von NK- Zellen, Makrophagen, Killerzellen;
- **Interferone:** fördern zum Teil die Abwehrbereitschaft von Körperzellen gegen Viren.

Skalp ist ein Eiweiß, das in Teilen der menschlichen Haut, Lunge und Brustdrüse gebildet wird. Es schützt diese Bereiche vor der Zerstörung durch Entzündung. Der Serin-Protease-

Inhibitor Skalp (skin-derived anti-leukoproteinase) wurde durch die Arbeitsgruppe Wiedow et al. entdeckt (Wiedow et al., 1990). Skalp, auch Elafin genannt, gehört zu der Trappin Familie (Trappin = TRansglutaminase Substrat und wAP-Domäne enthaltenes ProteIN), einer Gruppe von Proteinen, die Transglutaminase-Substrat sind und eine WAP (whey acidic protein) Domäne aufweisen. Diese Proteine werden im Gewebe eingefangen - "trapped"- und verankert und entfalten dort ihre Funktion. Skalp ist in gesunder Epidermis nicht nachweisbar (Pol et al., 2003), es findet sich aber in der Mundschleimhaut, Ösophagus und Vagina (Pfundt et al., 1996). Ebenso zeigt psoriatische Haut und Haut mit dermalen Infiltration von Neutrophilen ein deutliches Skalp-Signal in der subkornealen Dermis (Tanaka et. al., 2000). Steinert und Marekov wiesen 1995 Querverbindungen zwischen Skalp und Loricrin beziehungsweise Zytokeratin-1, zwei Strukturproteinen des "Cornified envelope", nach (Steinert und Marekov, 1995). Zusätzlich spielt Skalp eine Rolle in der natürlichen Immunität (Sallenave, 2002), da es Entzündungsmediatoren wie Metallproteinasen und die TNF- $\alpha$  herabreguliert. Jedoch besitzen die inneren Organe, insbesondere Muskulatur und Gefäße, kein Skalp und können bei Entzündungen direkt angegriffen und zerstört werden.

## 2.6 Hautmodelle und Zellkulturen

Als Zellkultur werden in dieser Arbeit aus menschlichem Gewebe gewonnene Keratinozyten bezeichnet, welche die umfassende normale epidermale Differenzierungskapazität beibehalten haben. Die genetische Spezifität dieser Zellen ändert sich auch durch eine langandauernde Kultivierung nicht, daher werden Keratinozyten in vielen pharmazeutischen, toxischen oder dermatologischen Prüfungen von Wirkstoffen eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Wirkstoffe mit den Keratinozyten in Kontakt gebracht und der Stoffeinfluss mittels DNA-Chiptechnologie anhand der isolierten und aufgearbeiteten RNA der Keratinozyten untersucht.

Für die Wirksamkeitsprüfung neuer Substanzen, anhand von Keratinozyten mittels DNA-Chiptechnologie muss die Zytotoxizität der Testsubstanzen für die Keratinozyten ausgeschlossen werden, da abgestorbene Zellen keine Effekte mehr zeigen. Die Grenzkonzentrationen der zu untersuchenden Testsubstanzen werden anhand von Zytotoxizitätsbestimmungen ermittelt.

Es gibt unterschiedliche zytotoxische Bestimmungsmethoden, die jeweils andere Parameter (z.B. Enzymkonzentrationen) als Messgröße verwenden. Im Rahmen dieser Arbeit werden die folgenden Bestimmungsmethoden im Rahmen der Zytotoxizitätsuntersuchung angewendet:

- Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH-Freisetzung),
- Messung von zellulärem ATP (ViaLight™ Plus),
- Freisetzen des Enzyms Adenylatkinase (ToxiLight™),
- optische Kontrolle anhand von mikroskopischen Aufnahmen.

Werden Zellen geschädigt oder sterben ab, kann ein Anstieg der LDH-Konzentration im Zellüberstand beobachtet werden [Dubar et al., 1993]. Ein Bestimmungsverfahren für die LDH-Konzentration im Zellüberstand ist von Warburg und Christian entwickelt worden und als "Optischer Test" bekannt.

Die Bestimmung der Zytotoxizität von zellulärem ATP erfolgt mittels Biolumineszenz. Diese Methode verwendet das Enzym Luciferase, welches die Bildung von Oxyluciferin unter Verbrauch von ATP bestimmt. Die Intensität des emittierten Lichts ist linear zur ATP-Konzentration und wird mittels ViaLight™ (Kapitel 3.4.2) gemessen.

Adenylatkinase ist ein Protein aller eukaryontischen Zellen, welches bei Zelltod in das Kulturmedium abgegeben wird. Die Bestimmung des Enzyms Adenylatkinase aus zerstörten Zellen wird mittels ToxiLight™ (Kapitel 3.4.3) durchgeführt.

Außer an Zellkulturen können Wirksamkeitsprüfungen auch an künstlicher menschlicher Haut durchgeführt werden, die aus den einzelnen, isolierten Zelltypen reorganisiert ist und sich aus einer rekonstruierten Oberhaut (Epidermis) zusammensetzt [Skinethic, 2005]. Die rekonstruierte Epidermis ähnelt histologisch der menschlichen und deren Eigenschaften als funktionale Permeabilitätsbarriere, welche die direkte Funktion der menschlichen Haut bestimmt [Ponec et al., 2001; Cannon et al., 1994].

Die Europäische Kommission (Dezernat 12, Generaldirektion Umwelt) unterstützt im Rahmen von Forschungsprojekten u.a. die Entwicklung und Evaluierung von künstlichen Hautmodellen. Im Jahre 2000 veröffentlichten Ponec et al. Untersuchungen, in denen drei kommerziell erhältliche Hautmodelle hinsichtlich Aufbau und Fähigkeit verglichen werden. Ponec bilanziert in dieser Arbeit für die Hautmodelle zufriedenstellende Ergebnisse für toxische Screenings, Penetrationsstudien und pharmakologische Risk Assessments [Ponec et al., 2000].

In der Literatur sind Studien beschrieben, die u.a. Keratinozyten und künstliche Epidermismodelle mit der menschlichen Haut mittels *DNA-Chip* vergleichen [Gazel et al., 2003]. Der wissenschaftliche Vergleich von drei Methoden (Haut, rekonstruierter Epidermis und 3 D-Modellen) mit kultivierten Keratinozyten in Hinblick auf die DNA-Replikationsgene und extrazelluläre Matrixproteine hat ergeben, dass alle drei Methoden durchaus miteinander vergleichbar sind. Es hat sich erwiesen, dass der Unterschied durch die Herkunft der Epidermis (Alter, Geschlecht etc.) einen wesentlich höheren Einfluss als die Unterschiede der einzelnen Methoden hat. Bislang sind uns keine aus der Literatur beschriebenen Methoden bekannt, die mit Untersuchungen auf Grundlage von Hautmodellen deren RNA-Isolierung in Kombination mit der RT-PCR-Methode beschreiben.

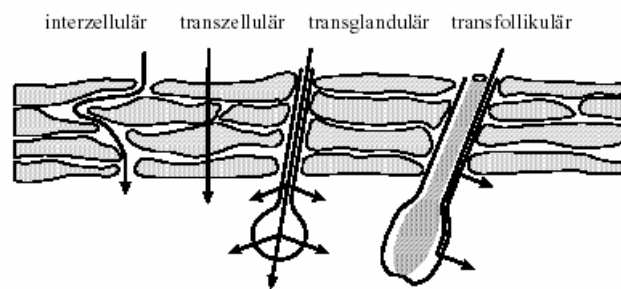
Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Methode weiterentwickelt, bei der die Wirkstoffe in einer typischen Cremeformulierung auf Hautmodelle aufgebracht und zunächst ihr zytotoxisches Verhalten anhand ihres Kulturmediums untersucht wird. Anschließend wird ihre Wirkweise untersucht, indem RNA aus den Hautmodellen isoliert und nicht mittels Gelelektrophorese [Ponec et al., 2000], sondern anhand der RT-PCR-Technik untersucht wird.

Zur Validierung der Methode werden die Einflüsse der zur Anwendung kommenden Leerformulierungen (Formulierungen ohne Wirkstoff) auf die eingesetzten Hautmodelle untersucht. Die RNA wird aus diesen Hautmodellen entsprechend isoliert und mit kommerziellen menschlichen RNA-Standards verglichen. Die so erhaltenen Ergebnisse werden in der anschließenden Wirkstoffüberprüfung als Kontrollwerte berücksichtigt.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Zellkulturen und Hautmodellen besteht in der Auftragung der zu untersuchenden Testsubstanzen. Während die Zellkulturen in dem KGM (Keratinocyte Growth Medium) vorliegen und nach ihrer Konfluenz direkt mit den gelösten Testsubstanzen im KGM versetzt werden, muss bei den Hautmodellen die Penetration der Testsubstanzen berücksichtigt werden.

## 2.7 Penetrationswege

Entsprechend den strukturellen Gegebenheiten der Haut können Stoffe in das *Stratum corneum* permeieren (Abbildung 7). Studien ergaben, dass für die follikuläre Penetration ein überraschend großer Einfluss auf das Penetrationsverhalten nachgewiesen werden konnte [Hueber et al., 1992].



**Abbildung 7:** Penetrationswege in die menschliche Haut (modifiziert nach Neubert, 2001)

### 2.7.1 Modulation des Stofftransportes durch die Haut

Primär ist der transepidermale Transport auf zwei unterschiedlichen Wegen nachvollziehbar – *interzellulär* und *transzellulär* [Loth, 1986; Loth 1987]. Ergänzend für den interzellulären Transport muss aus aktueller Sicht der *Pore-Pathway* angeführt werden. Unter Einwirkung von Energie (Sonophorese, Iontophorese) oder unter veränderten Applikationsbedingungen (Okklusion, Penetrationsmodulatoren) können sich neue Permeationswege eröffnen, die im Normalzustand der Haut nicht vorliegen. Diese *lacunaren Domänen* des *Stratum corneum* konnten als eindeutiger Transportweg für sowohl polare als auch apolare Stoffe identifiziert werden [Menon und Elias, 1997]. Während man früher eine Differenzierung für unpolare (laterale Diffusion entlang der lipophilen Anteile innerhalb der Bilayer) und polare Stoffe (Durchdringung des Corneozyten) annahm [Scheuplein, 1972], erscheint heute auch für polare Substanzen die Permeation via interzellulärer Routen (entlang der hydratisierten Kopfgruppe der Bilayerlipide) und durch die Poren der lacunaren Domänen als gesichert [Boddé et al., 1991].

## 2.7.2 Hautpenetration – die komplexen Parameter

Der limitierende Faktor der Hautpenetration ist der Transport durch das *Stratum corneum*. Das Verhalten von aktiven Substanzen in jedem Stadium der Penetration ist abhängig von ihren physikochemischen Eigenschaften. Einige wichtige physikochemische Eigenschaften sind:

- Öl-Wasser-Verteilungskoeffizient,
- Molekulargewicht und räumliche Struktur,
- Polarität und Ladung.

Für einen erfolgreichen Transport eines Wirkstoffes einer Cremeformulierung in die Haut sind eine Reihe von Schritten erforderlich:

- Aktivierung des Wirkstoffs z.B. Separation vom Trägermaterial (unterschiedliche Lipophilie) durch das lipophile *Stratum corneum*,
- Diffusion der Substanzen durch das *Stratum corneum*,
- Wanderung der Substanzen vom lipophilen *Stratum corneum* in die tieferliegende (und wesentlich wasserhaltigere) lebende Epidermis,
- Diffusion durch die lebende Epidermis in die tiefere Dermis,
- Aufnahme der aktiven Substanz über die Hautmikrozirkulation,
- Aufnahme der aktiven Substanz in die Zellen.

In den letzten 10 Jahren sind einige Methoden zur Penetrationsuntersuchung in der Literatur beschrieben worden. Zu den etablierten Methoden gehören:

- Nachweis radioaktiver markierter Substanzen in Exkrementen und Blut [Jimbow, 1998],
- Biopsien der Haut [Hurks et al., 1997],
- Saugblasentechnik [Falabella, 2000; Richer, 1995],
- Abrissmethode [Dreher et al., 1998; Pinkus, 1966],
- Oberflächenwiedergewinnung von Substanzen [Koizumi, 2000],
- Autoradiographie und Fluoreszenzmessungen [Zellmer et al., 1998],
- Penetrationsuntersuchungen mit Franz-Zellen [Ogiso et al., 1997].

Die qualitative und quantitative Penetration *in vivo* kann prinzipiell nur mit den letzten vier genannten Methoden getestet werden. Der Einsatz radioaktiver Substanzen ist beim Menschen ethisch problematisch. Die Entnahme von Biopsien und das Setzen von Saugblasen hinterlässt Narben, daher sollte man den wissenschaftlichen Nutzen sorgfältig abwägen. Insbesondere für Untersuchungen der Penetrationskinetik, die mehrere Proben erfordern, kommen diese Methoden nicht in Frage.

Es gibt weltweit anerkannte physiko-chemische Methoden zur Beschreibung von Subanzeigenschaften. Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient [OECD Guideline No. 117] für definierte Substanzen, wird vielfach in Modellrechnungen (Simulationen) verwendet, um u.a. das Verhalten dieser Substanzen in der Umwelt abzuschätzen bzw. modellieren zu können.

### 2.7.3 Verteilungskoeffizient Octanol / Wasser ( $\log P_{O/W}$ )

Der Verteilungskoeffizient bzw. der Partition Coefficient sagt etwas über die Polarität einer Substanz aus. Gemessen wird die Verteilung der zu untersuchenden Substanz in zwei weitgehend nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln, *n*-Octanol und Wasser. Der Verteilungskoeffizient wird üblicherweise als Logarithmus zur Basis 10 angegeben, Octanol/Wasser ( $\log P_{O/W}$ ) (dimensionslose Größe). Er ist definiert als:

$$\log P_{O/W} = \log_{10} (c_{n\text{-Octanol}} / c_{\text{Wasser}})$$

Die Verteilung einer Substanz bzw. ihre Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Lösungsmitteln ermöglicht eine Abschätzung des Penetrationsverhaltens. Generell lässt sich sagen, dass Substanzen mit einem  $\log P_{O/W} > 4$  nur bedingt in die oberen Hautschichten penetrieren werden. Um erste Informationen über die Penetrationseigenschaften der Verbindungen zu erhalten, werden in dieser Arbeit Berechnungen mit den Computerprogrammen "daylight" [daylight, 2005] und "syrres" [syrres, 2005] durchgeführt. Bei der Berechnung werden die statistisch ermittelten Einflussfaktoren einzelner Molekülfragmente auf den Gesamtverteilungskoeffizienten der Verbindung zugrunde gelegt. Korrekturfaktoren berücksichtigen die Anordnung der Fragmente im Molekül (Auswertung siehe Kapitel 4.1).

## 2.8 Bestimmung der Wirksamkeit durch Genexpressionen

Um die Wirksamkeiten von Wirkstoffen in Zellkultur sowie bei künstlichen Hautmodellen nachweisen zu können, müssen geeignete Methoden gefunden werden. Durch die Entwicklung hoch sensitiver molekularbiologischer Verfahren wie der Real-Time-RT-PCR- und der Microarray- (DNA-Chip) Technik ist die Quantifizierung von Genexpressionsraten mittlerweile weit verbreitet und wird in zahlreichen Labors durchgeführt.

### 2.8.1 Microarray

Eine Methode, die Wirksamkeit kosmetischer und pharmazeutischer Fertigerzeugnisse zu untersuchen, ist die Verwendung von Microarrays (DNA-Chips). Nach der (nahezu) vollständigen Sequenzierung des menschlichen Erbguts konzentrieren sich Biowissenschaftler nun vor allem darauf, die Genfunktion und ihre Regulation zu verstehen. Neue Erkenntnisse sind in der biologischen Grundlagenforschung und für die medizinische Diagnostik von immenser Bedeutung. Sowohl in der Biologie als auch in der Pharmazie nutzt man die Microarraytechnologie, um neue Erkenntnisse über die Vorgänge in der Zelle sowie auf molekularer Basis zu gewinnen [Schulze und Downward, 2001; Chuaqui et al., 2002].

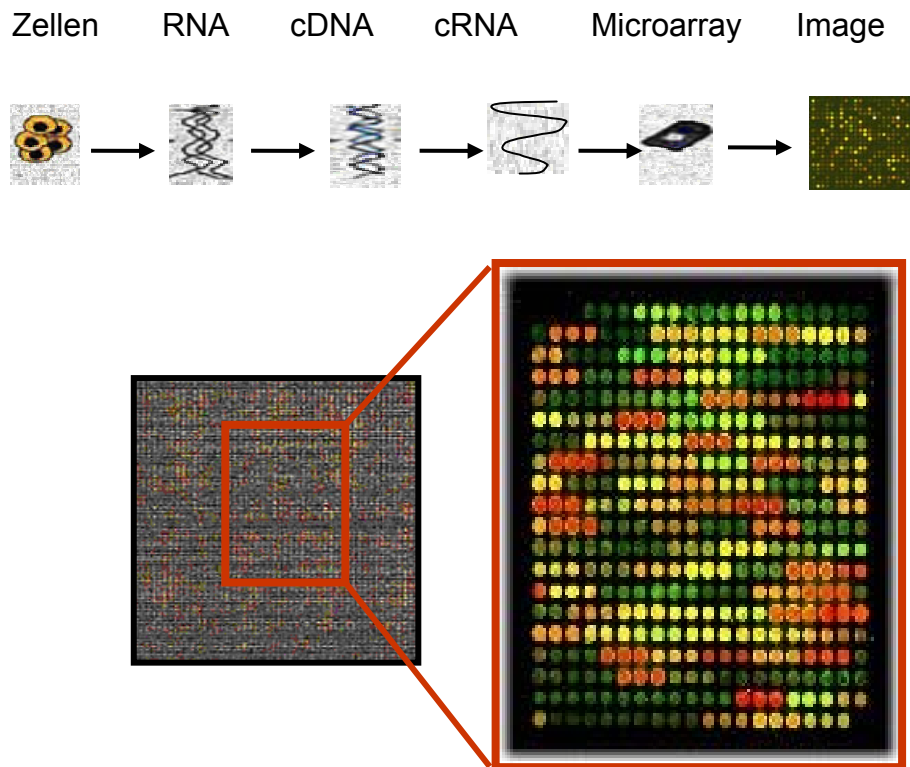
DNA-Chips bestehen aus einer geordneten Aufstellung hunderttausender Oligonucleotide auf einer modifizierten Glasoberfläche. Diese sind komplementär zu zellulärer RNA. Nach einer Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung dieser zellulären RNA können diese im Experiment mit der entsprechenden komplementären Probe hybridisieren. Hierdurch werden sie geordnet und sind quantifizierbar. Die Microarrays sind konzipiert als Hochdurchsatz-Instrumente, insbesondere haben sie sich für Vergleichsstudien wie beim Gen-Expression-Profiling bewährt. Es lassen sich mittels dieser Methode Aktivitätsmuster von Genen im Organismen, Geweben und Zellen analysieren. Weitere Anwendungsgebiete könnten Microarrays in der Krankheitsdiagnostik (Typisierung von Krebsformen oder Infektionserregern) und für pharmakogenetische Tests erschließen. Die Entwicklung von Microarrays wie auch die Durchführung der Experimente werden zunehmend standardisiert und vereinheitlicht. Dazu gehören umfassende Validierungen spezifischer Arrays, die für eine Anwendung im diagnostischen Bereich Voraussetzung sind.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass mittels Microarraytechnologie eine Veränderung der Genexpression festgestellt werden kann, nachdem menschliche Keratinozyten mit unterschiedlich dosiertem UV-Licht bestrahlt wurden [Sesto, 2002; Deling et al., 2001].



Die unterschiedliche Aktivität der Gene in der Zelle wird als differentielle Genexpression bezeichnet und ist zum Beispiel dafür verantwortlich, dass Raupe und Schmetterling völlig unterschiedlich gestaltet sind, obwohl sie identisches Erbgut besitzen. Die Expression tausender Gene oder ganzer Genome gleichzeitig zu analysieren ist jedoch sehr aufwändig und erfordert parallele Ansätze. Als beste Methode für die Analyse und quantitative Erfassung der Genexpression auf breiter Ebene bietet sich die Verwendung von DNA-Chips (z.B. Affymetrix ) an. Das Prinzip eines Chip-Experimentes besteht darin, eine große Anzahl genau definierter DNA-Fragmente, die im Idealfall die gesamte Transkription einer Zelle abdecken, auf eine modifizierte Glasoberfläche aufzutragen und diese als Matrix für die Genaktivität zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Prozessierung, der aus dem Probenmaterial isolierten RNA auf den DNA-Chip, nach dem von Affymetrix vorgegebenen Protokoll. Hierbei wird die zelluläre RNA zunächst durch reverse Transkription in einzelsträngige, dann in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese wird in cRNA umgeschrieben, fragmentiert und auf dem Chip sequenzspezifisch mit den dort aufgebrachten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Demnach werden in einem Schritt alle Genproben auf dem Chip parallel hybridisiert, was zu einem charakteristischen Hybridisierungsmuster mit entsprechender Intensitätsverteilung führt. Die Detektion erfolgt im Anschluss durch das Fluoreszenzsignal, welches mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanners gemessen wird (Abbildung 8). Die Menge an emittiertem Licht ist der Menge an gebundenen cRNA-Fragmenten proportional. Die Verteilung der Fluoreszenzsignale wird für jeden Farbstoff einzeln bestimmt, anschließend werden die Bilder digital übereinandergelegt. Ist eine RNA unter einer der beiden Bedingungen verstärkt exprimiert, so wird ihr Fluoreszenzsignal das des anderen Farbstoffes überdecken. Der entsprechende Sondenspot erscheint im übereinandergelegten Bild in grün bzw. in rot. Bei einer gleichstarken Expression unter beiden Bedingungen wird die Mischfarbe gelb erhalten. Durch den derzeitigen Stand der Technik lassen sich auf einem fingernagelgroßen Plättchen 10.000 bis 500.000 DNA-Sonden unterbringen [Lipshutz et al., 1999; Ullmann, 2005].



**Abbildung 8:** Prinzip eines Affymetrix-GeneChip®, Array Scan [modifiziert nach Kussebin, 2003]

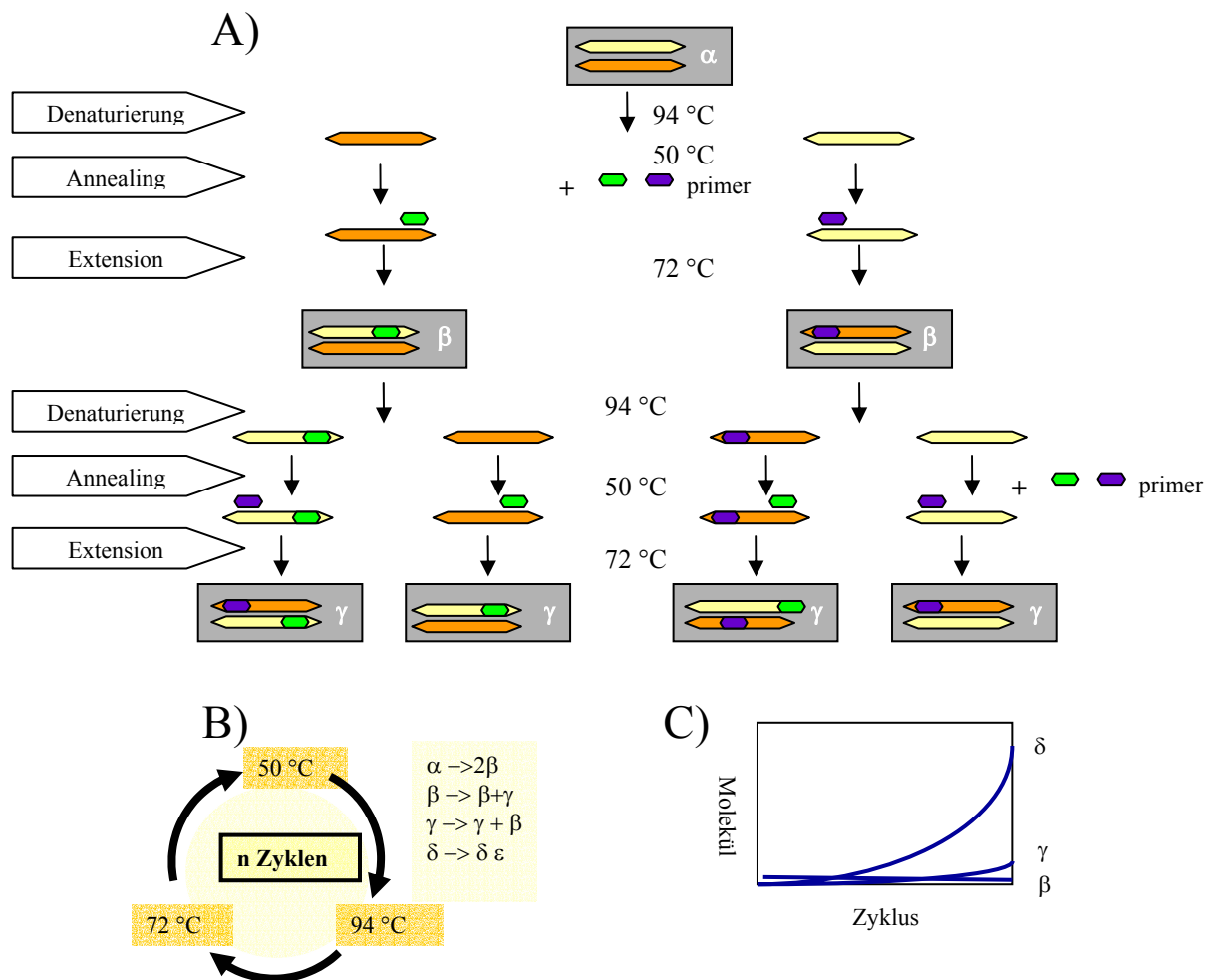
Wir wissen heute, dass der Mensch etwa 25.000 Gene besitzt. Gene sind chemisch gesehen nichts anderes, als eine lange Folge definierter DNA-Sequenzen. Die DNA-Chiptechnologie bietet nun einen vielversprechenden Zugang, um die Wirkweisen z.B. neuer kosmetischer Stoffe zu untersuchen. Sie ermöglicht neue Einblicke in den genetischen Mechanismus, wodurch Aussagen über die Effekte von Stoffen in der lebenden Haut möglich werden. Die DNA-Chip-Analytik bietet somit einen groben Überblick über Regulationsvorgänge. Man ist in der Lage, viele verschiedene Gene einer Probe nebeneinander zu analysieren und nähere Informationen über die Eigenschaften und Wirkungsweisen des jeweiligen Wirkstoffs zu erhalten.

### 2.8.2 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die real-time-PCR stellt eine Weiterentwicklung der Mitte der achtziger Jahre von K.B. Mullis entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dar. In den vergangenen Jahren hat die Untersuchung von Genexpressionsraten, das heißt, die Untersuchung der Aktivität eines Gens, in der biomedizinischen Forschung mehr und mehr an Bedeutung gewonnen. Sie ist ein wichtiges Werkzeug der modernen Molekularbiologie geworden, da sie im Bereich der Sequenzanalyse, bei Genexpressionsstudien und bei der

Genklonierung eingesetzt wird [Scharf et al., 1986; Erlich et al., 1991]. Bei der RT-PCR werden gezielt einzelne mRNA-Transkripte amplifiziert. Durch eine Überwachung der Produktbildungsrate lässt sich die ursprüngliche vorhandene mRNA relativ zu einem internen Standard bestimmen und zwischen verschiedenen experimentellen Proben vergleichen. Hierdurch können Unterschiede in der Genexpression analysiert werden. Die Grundlage für die heute angewandte real-time-PCR wurde 1993 durch Higuchi et al. geschaffen. Er stattete die PCR-Maschine mit einer UV-Lampe und CCD-Kamera aus und fügte der PCR-Reaktion Ethidiumbromid (EtBr) zu. Dies fluoresziert, wenn es in doppelsträngige DNA eingebaut und durch UV-Licht angeregt wird. So konnte die Fluoreszenz gemessen und die Konzentration der Ziel-DNA bestimmt werden [Higuchi et al., 1993].

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein sehr sensitives Verfahren, das es ermöglicht, Nukleinsäurefragmente spezifisch zu amplifizieren [Mullis und Faloona, 1986]. So ist es möglich, die Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenz, die beispielsweise für eine mRNA-Sequenz, einen Erreger oder eine Genmutation charakteristisch ist, innerhalb eines Nukleinsäuregemisches nachzuweisen. Für die Untersuchung von mRNA-Sequenzen und damit der Aktivität eines Gens ist es notwendig, diese mittels reverser Transkription in komplementäre cDNA umzuschreiben. Durch hohe Temperaturen (ca. 95 °C) wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt (denaturiert), so dass die Zielsequenz flankierende Oligonukleotide (*Primer*) nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung binden kann (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der PCR. A) Die cDNA mit der Zielsequenz wird durch Hitzeeinwirkung in die Einzelstränge aufgeschmolzen. B) Durch Wiederholungen des Temperaturprogramms nimmt die Gesamt-Produktmenge expotentiell zu. C) Hieraus entsteht in den weiteren Zyklen das gewünschte, beidseitig terminierte Produkt [Wilhelm, J, 2003]

Diese Primer sind gegenläufig und komplementär zu der Sequenz des zu amplifizierenden Abschnittes und binden bei einer Temperatur von 50 °C (*Annealing*). Bei einer Temperatur von 72 °C werden die Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase an ihrem 3'-Ende beginnend verlängert (*Elongation*) und dann durch Temperaturerhöhung erneut in Einzelstränge getrennt, die jetzt wieder als Matrize (*Template*) dienen. Diese drei Schritte werden wiederholt. So ist es möglich, eine bestimmte Sequenz exponentiell zu vervielfältigen. Mit der RT-PCR Methode ist man in der Lage, viele Proben nebeneinander zu analysieren. Anhand der Auswertung der verschiedenen Gene kann eine Charakterisierung der Eigenschaften und Wirkweisen des jeweiligen Wirkstoffs erhalten werden. Die RT-PCR ist

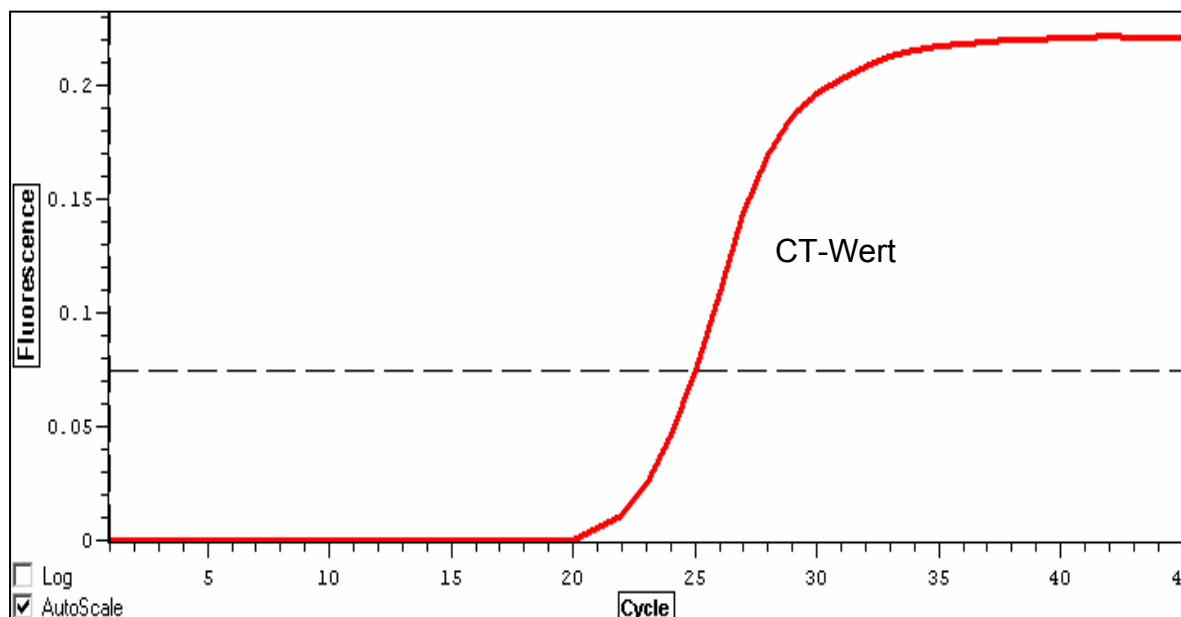
eine weit verbreitete Methode zur Quantifizierung des steady-state-mRNA-Levels. Ebenso wird diese Methode für Grundlagenforschung und pharmakologische Untersuchungen eingesetzt, da es eine empfindliche Hochdurchsatz-Methode ist. Durch die Einführung neuer Enzyme, Chemikalien und Instrumente ist die Entwicklung dieser Technologie weit fortgeschritten [Bustin, 2002].

### **Real Time Analyse**

Bei dieser Methode wird nicht das Endprodukt untersucht, sondern die Bildung dieses Produktes im Laufe der PCR [Freeman et al., 1999]. Es entsteht weder ein zusätzlicher Zeitaufwand, noch ein weiteres Kontaminationsrisiko, da nach der PCR keine weiteren Manipulationen nötig sind [Buston, 2000]. Das Prinzip dieser Methode liegt darin, mit jedem Amplifikationsschritt durch den Einsatz fluoreszierender Farbstoffe ein vom Gerät detektierbares Signal zu generieren, welches mit der jeweils vorhandenen Menge an PCR-Produkten korreliert. Der Anstieg der Fluoreszenz wird während eines jeden Zyklus gemessen. Auch bei der Real-Time-RT-PCR kann das zu untersuchende Gen mit einem als Kompetitor zu der Probe gegebenen Standard verglichen werden [Gibson et al., 1996] oder es wird ein ebenfalls in der Probe vorhandenes Gen, das in derselben Reaktion amplifiziert wurde, als Bezugsgröße verwendet [Heid et al., 1996].

### DNA-bindende Farbstoffe

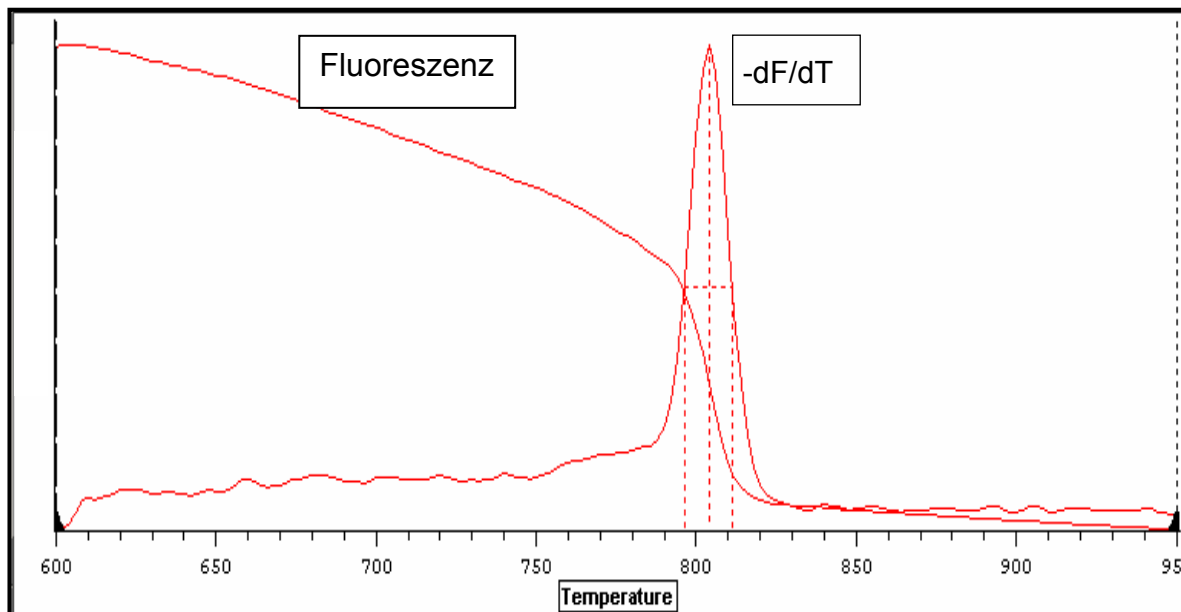
Es wird ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR-Green<sup>TM</sup>) eingesetzt, der in doppelsträngige DNA intendiert wird [Morrisson et al., 1998]. Die Spezifität kann anhand einer Dissoziationskurve überprüft werden [Ririe et al., 1997]. Dabei wird das PCR-Produkt nach dem letzten Zyklus durch langsame Erhitzung denaturiert, wodurch anhand der so ermittelten Schmelzpunkte die Längen der im Reaktionsgemisch vorhanden PCR-Produkte und damit die Spezifität der Reaktion bestimmt werden können.



**Abbildung 10:** Typischer Verlauf einer PCR-Kurve gemessen mit dem DNA Engine Opticon anhand einer Testsubstanz  
CT-Wert: Schwellenwert-Zyklus (Threshold cycle)

### Schmelzkurvenanalyse

Die in der PCR entstandenen Produkte können zudem im Anschluss an die Amplifikation mittels Schmelzpunktanalyse charakterisiert werden, z.B. um bei SYBR-Green-I-Detektion zu bestimmen, ob ein spezifisches Produkt gebildet wurde, oder um Sequenzvariationen zu identifizieren bzw. Mutationen nachzuweisen. Dazu wird die Fluoreszenz kontinuierlich aufgezeichnet, während die Temperatur der Reaktionsansätze langsam erhöht wird (60 °C auf 95 °C). Bei Überschreiten der Schmelztemperatur des detektierten Produktes fällt das Signal durch den kooperativen Prozess des Aufschmelzens der DNA stark ab. Diejenige Temperatur, bei welcher die Signalabnahme maximal ist, wird definionsgemäß als Schmelztemperatur bezeichnet. Die Menge geschmolzenen Produkts ist näherungsweise proportional zum Betrag des Signalunterschieds vor und nach dem Schmelzprozess.



**Abbildung 11:** Schmelzkurvenverlauf eines PCR-Laufes gemessen mit dem DNA Engine Opticon anhand einer Testsubstanz

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Folgende Materialien standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung bzw. wurden käuflich erworben:

Ammoniak	Sigama Aldrich Chemie, Steinheim
Bromkresolgrün	Sigama Aldrich Chemie, Steinheim
Chloroform	Sigama Aldrich Chemie, Steinheim
Chloroform	Sigama Aldrich Chemie, Steinheim
Collagenase Puffer	Serva, Heidelberg
DEPC-Treated Water	Ambion Inc., Woodward, USA
Diethyether	Sigama Aldrich Chemie, Steinheim
Diisopropylcarbodiimid	Merck-Schuhardt OHG, Hohenbrunn
Dispase II	Roche Diagnostics GmbH, Basel, Mannheim
Eisessig	Sigama Aldrich Chemie, Steinheim
Ethanol	Sigama Aldrich Chemie, Steinheim
Hexansäure	Merck KGaA, Darmstadt
Human Skin Poly A+ RNA	Biosciences Clontech, Heidelberg
1-Hydroxybenzotriazol	Cosmoferm B.V., Degussa, Delft Holland
Kieselgel 60 silicagel 60	Fluka, Taufkirchen
Kieselgel 60F 254 5*7,5c	Merck KGaA, Darmstadt



Maintenance Medium	Skinethic, Frankreich
Mercaptoethanol	Merck-Schuhardt OHG, Hohenbrunn
Methanol, Isopropanol	Riedel de Hën AG, Seelze
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL
NADH	Applichem GmbH, Darmstadt
Ninhydrin	Sigama Aldrich Chemie, Steinheim
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin	Cosmoferm B.V., Degussa, Delft Holland
Phytosphingosin	Cosmoferm B.V., Degussa, Delft Holland
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
Pyruvat	Sigma Aldrich, Steinheim
Qiazol <sup>TM</sup> Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit (50) Cat No. 74104	Qiagen, Hilden
Salicylsäure	Merck-Schuhardt OHG, Hohenbrunn
SuperScript III First Strand	Invitrogen life Technologies, Karlsruhe Synthesis System for RT-PCR
TEGIN M	Degussa AG, Essen
TEGO Alkanol 18	Degussa AG, Essen
TEGO Care 450	Degussa AG, Essen
TEGOSOFT liquid	Degussa AG, Essen
Tetrathydrofuran	Riedel de Hën AG, Seelze
ToxiLight <sup>TM</sup> -Kit	Cambrex, USA
Triethylamin	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin-Lösung II	Biochrom AG, Berlin
ViaLight <sup>TM</sup> Plus-Kit	Cambrex, USA

### 3.1.1 Lösungen

PBS Phosphatpuffer: phosphatgepufferte Kochsalzlösung: 8,76 g (150 mmol) NaCl und 1,36 g (10 mmol) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> werden in ca. 500 ml bidestilliertem Wasser mit 2 M KOH auf pH = 7,4 eingestellt und anschließend auf 1 L mit Wasser aufgefüllt.

Tram Puffer: 14,92 g Triethylamin werden in ca. 80 ml bidestilliertem Wasser mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt, anschließend werden 930,6 mg EDTA zugeben und die Lösung auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt (Lagerung 4 °C).

Testmischung für die LDH Bestimmung: 20 µL Tram Puffer, 4 µL Mercaptoethanol (5 mM in Wasser, Lagerung 4 °C), 4 µL NADH (12 mM in Wasser Lagerung -20 °C), 4 µL Pyruvat (23 mM in Wasser, Lagerung -20 °C) werden mit 128 µL Wasser versetzt.

cDNA Lösung: 2 µL 10\*RT Puffer, 4 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL DTT (0,1 M), 1 µL RnaseOut (40U / µL) werden mit 1 µL SuperScript III RT (200U / µL) versetzt.

### 3.1.2 Geräte

Gefrierschrank -80 °C	Typ 6483, Zusatz CO <sub>2</sub> Anlage, Fabrikat Nr. 93893, Gesellschaft für Labortechnik, Wunstorf
Gefriertruhe -80 °C	Typ HAT 1086, Hettich, Tuttlingen
Hautmodelle	Skinethic, NICE, Frankreich
Heizblock PCR	advanced Primus 96, PeQLeb, Erlangen
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Küvetten	Schichtdicke 10 mm, Zentrum 15 mm, Hellma, Mülheim
Mikrotiterplatten	MJ Research Hard-Shell, Biozym Hessisch Oldendorf
QI Ashredder™	(50) Cat. No. 79654, Qiagen, Hilden
RT-PCR-Gerät	DNA Engine Opticon, (Continuous Fluorescence Detector) von MJ ResearchSoftware, Bio-Rad, München

Software (RT-PCR)	Opticon MonitorAnalysis software Version 1.08(c) 2002 MJ Research, Incorporated
Spektrophotometer	Helios $\beta$ , Thermo Spectronic, Cambridge, UK
Spektrophotometer	SmartSpec TM Puls, Bio-Rad, München
Stahlkugel	Stainless Steel Beads (5 mm), Qiagen, Hilden
TissueLyser	Retsch / Qiagen, Hilden
Zauberstab	Type M 100, 230 V, 120 W, ESGE
Zentrifuge	a) Vortex, Combi Spin FVL-2400, PeQLeb Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zentrifuge	b) Centrifuge 5415R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

### 3.1.3 Analytische Gerätedaten

Für die NMR-Spektren wurden Spektrometer vom Typ DPX Advanced 400 ( $^1\text{H}$  bei 400.1 MHz;  $^{13}\text{C}$  bei 100.6 MHz) der Firma Bruker verwendet. Alle Messungen wurden falls nicht anders angegeben bei 20 °C durchgeführt. Die Restprotonensignale der deuterierten Lösungsmittel dienen als interne Standards. Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ - Signale bestimmter Verbindungen wurden durch Aufnahme von ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) COSY-NMR-Spektren gesichert.

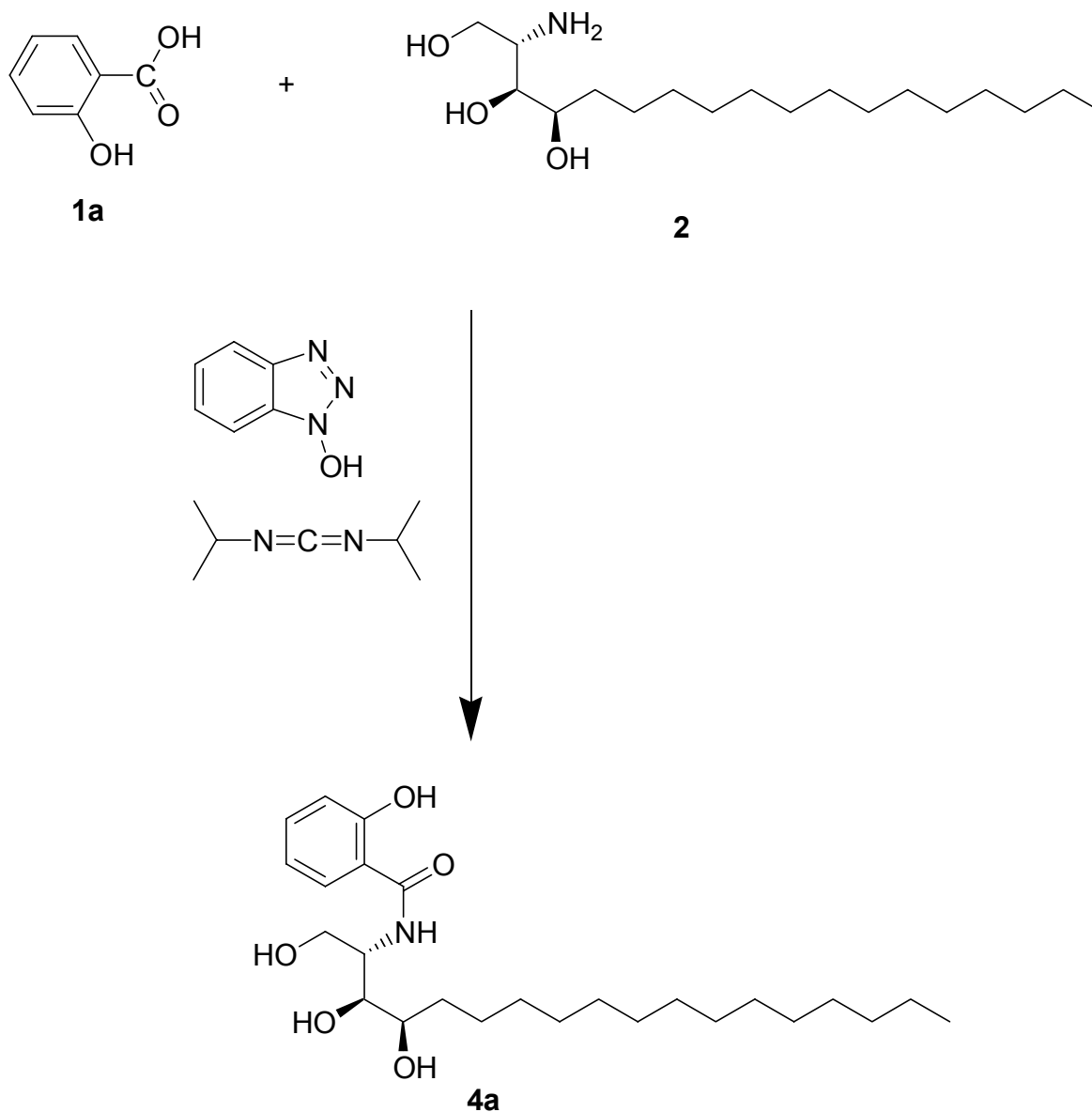
Die Massenspektren wurden mit Spektrometer des Typs MAT 5973 der Firma Agilent bzw. für GC-Spektren mit dem 6890II der Firma Agilent aufgenommen. Als Ionisierungsmethode wurden sowohl Elektronenstoß (EI, 70 eV), als auch chemische Ionisation (Trärgas Helium) verwendet. Zur Derivatisierung der Produkte wird als Silylierungsmittel MSTFA (*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid) verwendet. Die Derivatisierung der Verbindungen erfolgt bei einer Tempertaur von 80 °C und einer Dauer von 30 Minuten.

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgt an einem FTS 40Pro der Firma DIGILAB. Feststoffe werden als Kaliumbromid-Pressling gemessen.

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgt an einem Heλios β, Thermo Spectronic der Firma Cambridge. Die Substanz wird als isopropanolische Lösung in Quarzküvetten (1 cm) gemessen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Darstellung von *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**)



**Abbildung 12:** Darstellung von *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**)

**Durchführung**

12,50 g (39,37 mmol) Phytosphingosin (**2**), 6,25 g (45,25 mmol) Salicylsäure (**1a**), 107,50 ml THF und 5,63 g (41,67 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol werden unter Stickstoff in einen Rundkolben gegeben und diese Lösung bei 15 °C mit einem KPG-Rührer gerührt. Innerhalb von 14 min werden 7,5 ml Diisopropylcarbodiimid (48,14 mmol) zugegeben und diese Lösung auf 35 °C erwärmt. Nach einer Rührzeit von 1,5 h werden 6,25 ml Wasser hinzugeben und bei einer Temperatur von 80 °C das THF durch Destillation entfernt, die Destillationsmenge beträgt 100 ml. Die Lösung wird auf 40 °C abgekühlt und nacheinander 125 ml Methanol und 31 ml Wasser hinzugegeben.

Es wird auf 0 °C abgekühlt und für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Der ausgefallene Niederschlag wird abfiltriert und mit einer 0 °C kalten Mischung von 62,50 ml Methanol und 25 ml Wasser gewaschen.

Der Filterkuchen wird mit 113 ml Methanol suspendiert und in einen Rundkolben überführt. Das Produkt wird durch Erwärmen unter Rückfluss auf 63 °C in Lösung gebracht und der pH-Wert mit 50 % iger Natronlauge von pH 3,7 auf pH 10,7 eingestellt. Die Lösung wird weitere 1,5 h unter Rückfluss bei 63 °C erwärmt und danach der pH Wert von 10,7 auf 6,7 eingestellt. Die pH-Wertabsenkung mit konzentrierter Essigsäure erfolgt zur Verringerung der Nebenprodukte. Eines der Hauptnebenprodukte ist das *N*-1-*O*-Disalicyloyl-phytosphingosin, welches durch dieses Vorgehen zum *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) zurückreagiert. Die Mischung wird heiß filtriert und der Rückstand mit 12,50 ml Methanol gewaschen. Zu dem Filtrat werden nacheinander 50 ml Methanol und 25 ml Wasser gegeben und die Mischung unter Rühren innerhalb von einer Stunde auf 0 °C abgekühlt. Die Bildung des Niederschlags beginnt bei 27 °C. Es wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt und der entstandene Rückstand abfiltriert, mit einer 0 °C kalten Mischung aus 75 ml Methanol und 25 ml Wasser gewaschen. Die Trocknung des Niederschlags erfolgt über Nacht (17 h) im Ventilations-trockenschrank bei 35 °C und weitere 8 h unter Vakuum bei 40 °C. Die Verbindung **4a** wird als weißer Feststoff erhalten, mittels Säulenchromatographie gereinigt und mittels Dünnschichtchromatographie auf Reinheit überprüft.

### 3.2.2 Charakterisierung der Verbindung *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)

Die Verbindung *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) wird nach der Synthese gereinigt und die Reinheit mittels Dünnschichtchromatographie und anhand von analytischen Daten (GC-MS, EA, UV, IR und NMR) überprüft.

#### Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie

Material: Kieselgel 60F 254, Firma Merck  
 Laufmittel: Diethylether/Ethanol/Ammoniak (60 ml : 30 ml : 10 ml)  
 Sprühreagenz: 0,2 %ige Ninhydrinlösung in Isopropanol

**Tabelle 2:** Dünnschichtchromatographie: R<sub>f</sub>-Werte

Proben	R <sub>f</sub> -Wert
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> )	0,82
Phytosphingosin ( <b>2</b> )	0,66 (rot)
Salicylsäure ( <b>1a</b> )	0,44
1-Hydroxybenzotriazol	0,33

Auf den Dünnschichtchromatogramm zeigen die Verbindungen *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**), Salicylsäure (**1a**) und 1-Hydroxybenzotriazol im UV-Licht eine sichtbare Bande. Die Verbindung Phytosphingosin (**2**) zeigt nach dem Besprühen mit dem Sprühreagenz Ninhydrin eine Rotfärbung. Anhand der R<sub>f</sub>-Werte der Ausgangsverbindungen ist zu erkennen, dass die chemische Umsetzung der beiden Reaktionspartner stattgefunden hat, da keine Edukte mehr sichtbar waren. Das Dünnschichtchromatogramm der synthetisierten Verbindung *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) zeigt eine Verunreinigung durch das 1-Hydroxybenzotriazol. Eine Auftrennung der Verbindungen erfolgt mittels Säulenchromatographie.

#### Reinigung mittels Säulenchromatographie

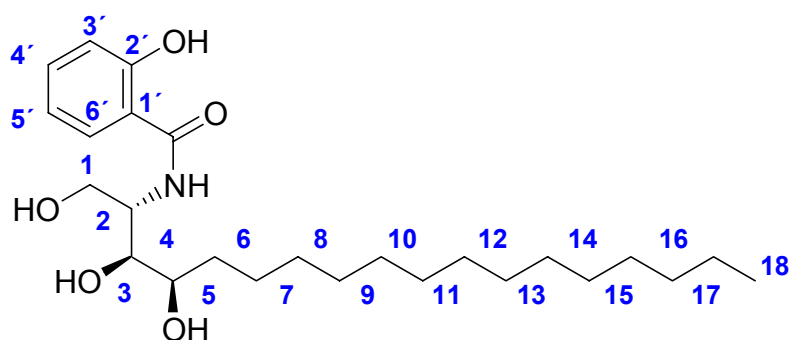
Säulenmaterial: Kieselgel 60 Silica gel 60  
 Säulenhöhe: 15 cm, Ø 4 cm  
 Laufmittel: Diethylether /Ethanol/Ammoniak (60 ml : 30 ml : 10 ml)

Die gesamte Probe wird in Isopropanol gelöst und mittels einer Spritze auf die Säule aufgetragen. Es werden Fraktionen zu je 10 ml portioniert und die Reinheit zunächst mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Die Produktfraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt. Das so erhaltene und gereinigte Produkt (**4a**) wird analysiert.

(2S,3S,4R)-*N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**)

**Ausbeute:** 11,90 g (27,2 mmol); 66,1 %

**Summenformel:** C<sub>25</sub>H<sub>43</sub>O<sub>5</sub>N; relative Molekülmasse: M = 437 g mol<sup>-1</sup>



**4a**

**Abbildung 13:** Nummerierung der Verbindung **4a** für die spektroskopische Auswertung

Für die GC-MS-Analyse wird die Verbindung **4a** silyliert, daraus ergibt sich eine Molmasse von M = 797.

**GC-MS:** *m/z* (% Rel. Int.) (EI): 797 (1), 401 (4), 397 (100), 299 (15), 193 (10)

**EA:**

	C [%]	H [%]	N [%]
<b>theor.:</b>	68,61	9,90	3,20
<b>exp.:</b>	68,18	9,61	3,06

**UV** (Isopropanol):  $\lambda_{\max}$  = 208 nm, 240 nm, 302 nm

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3365 (s), 3252 (s) (ν NH, OH), 2920 (s), 2850 (s) (ν CH), 1630 (s) (ν C=O), 1558 (s), 1053 (w) (ν CO), 754 (w) (CH)

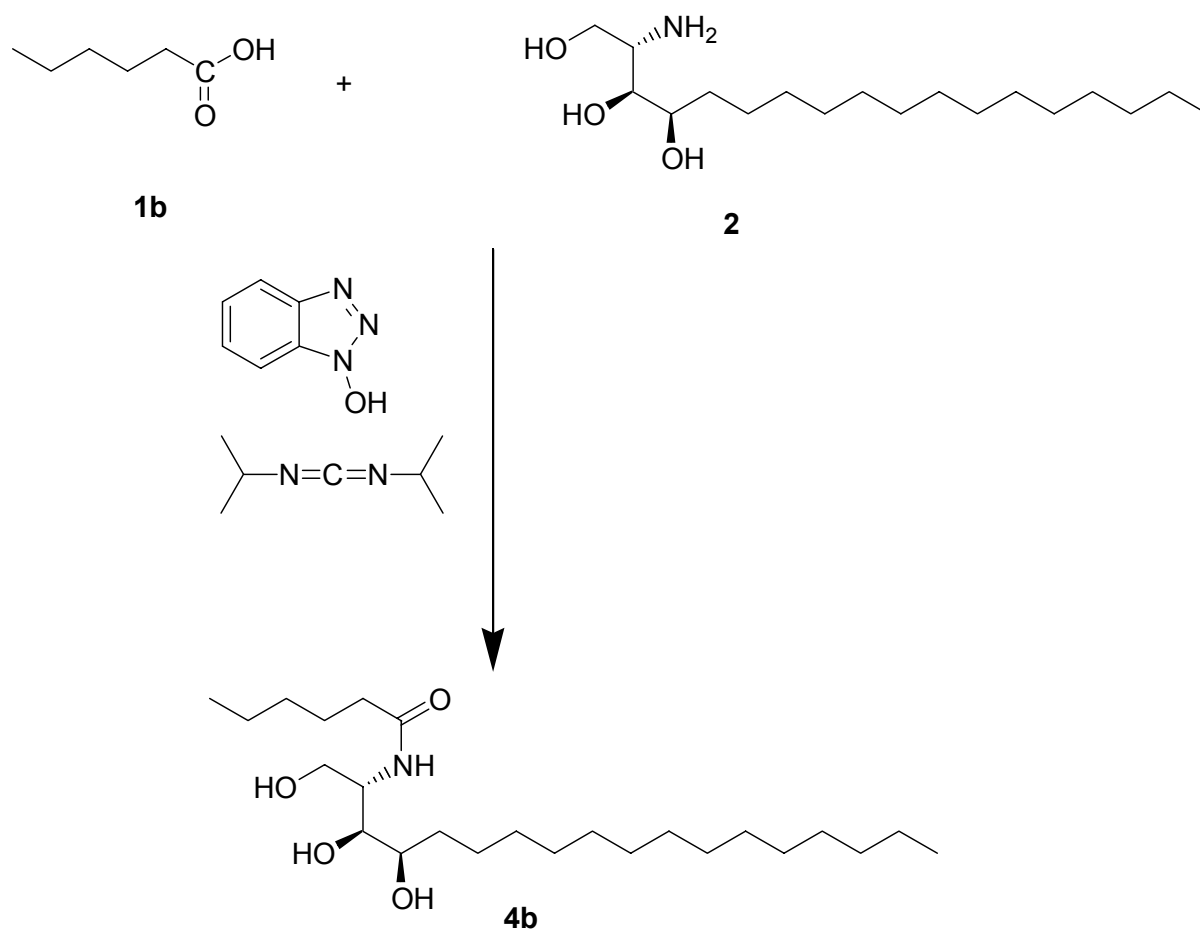


$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0.8 (t, 3 H,  $\text{CH}_3$ , H-18), 1.2 (x, 24 H,  $\text{CH}_2$ , H6-17), 3.5 (1 H, C4- $\text{CHOH}$ ), 3.8 (1 H, H-3), 4.2 (m, 1 H, H-2), 4.4, 4.6, 4.75 (m, H, OH), 6.9 (1 H, H-3'), 7.3 (1 H, H-5'), 7.9 (1 H, H-6'), 8.5 (1 H, H-4'), 12.5 (s, 1 H, -NH)

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.0 ( $\text{CH}_3$ , C-18), 22.0 ( $\text{CH}_2$ , C-17), 25.0, 28.0, 29.0, 31.0, 32.0 ( $\text{CH}_2$ , C-5 - C-16), 53.0 (C-2), 60.0 (C-1), 71.0 (C-4), 74.0 (C-3), 116.0 (C-4'), 117.0 (C-5'), 118.0 (C-1'), 127.0 (C-6'), 133.0 (C-3'), 159.0 (C-2'), 168.0 (C-7')

Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ - Signale der Verbindung **4a** wird durch Aufnahme von ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) COSY-NMR-Spektren gesichert.

### 3.2.3 Darstellung von *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**)



**Abbildung 14:** Darstellung von *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**)

### Durchführung

Zur Durchführung der Synthese siehe Kapitel 3.2.1, die Mengenangaben befinden sich in Tabelle 3.

**Tabelle 3:** Mengenangaben für die Darstellung von *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**)

Substanz	Einwaage
Phytosphingosin ( <b>2</b> )	3,80 g (11,97 mol)
Hexansäure ( <b>1b</b> )	1,40 g (12,05 mol)
THF	30,70 ml
1-Hydroxybenzotriazol	1,60 g (11,84 mol)
Diisopropylcarbodiimid	2,2 ml (14,12 mol)

Die Verbindung **4b** wird als weißer Feststoff erhalten, mittels Dünnschichtchromatographie auf Reaktionsnebenprodukte bzw. Reinheit überprüft und durch Säulenchromatographie gereinigt.

### 3.2.4 Charakterisierung der Verbindung *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**)

Die Verbindung *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) wird nach der Synthese gereinigt und die Reinheit mittels Dünnschichtchromatographie und anhand von analytischen Daten (GC-MS, EA, IR und NMR) überprüft.

#### Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie

Material: Kieselgel 60F 254, Firma Merck  
 Laufmittel: Chloroform/Methanol/Eisessig (9,5 ml : 0,45 ml : 0,05 ml)  
 Sprühreagenz: Bromkresolgrün in Ethanol

**Tabelle 4:** Dünnschichtchromatographie: Rf-Werte

Proben	Rf-Wert
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )	0,29 (blau)
	0,12 (gelb)
Phytosphingosin ( <b>2</b> )	0,03 (blau)
Hexansäure ( <b>1b</b> )	0,59 (gelb)
1-Hydroxybenzotriazol	0,12 (gelb)

Die Verbindung Phytosphingosin (**2**) und *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) zeigen nach dem Besprühen mit dem Sprühreagenz eine Blauverfärbung, die anderen Verbindungen zeigen hingegen eine gelbe Verfärbung. Anhand der Rf-Werte ist zu erkennen, dass die chemische Umsetzung der beiden Reaktionspartner stattgefunden hat, da keine Edukte mehr detektiert sind. In der DC der synthetisierten Verbindung *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) zeigt sich eine Verunreinigung durch das 1-Hydroxybenzotriazol. Eine Auftrennung dieser beiden Verbindungen erfolgt mittels Säulenchromatographie.

#### Reinigung mittels Säulenchromatographie

Die Reinigung von *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) erfolgt mittels Säulenchromatographie.

Säulenmaterial: Kieselgel 60 Silica gel 60

Firma Fluka

Säulenhöhe: 15 cm, Ø 4 cm

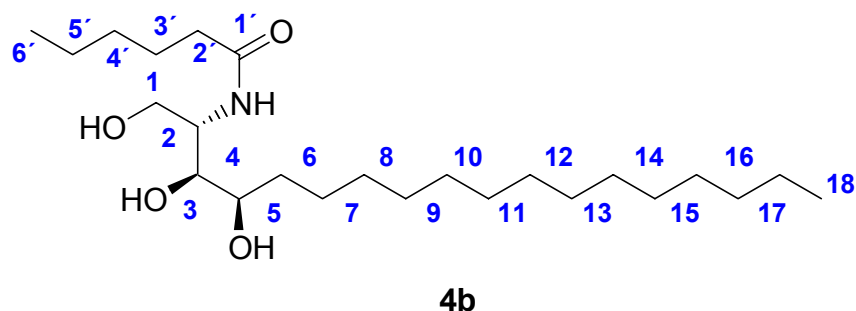
Laufmittel: Chloroform/ Methanol/ Eisessig (95 ml : 4,5 ml : 0,5 ml)

Die gesamte Probe wird in Isopropanol gelöst und mit einer Spritze auf die Säule gegeben. Es werden Fraktionen (je 10 ml) portioniert und diese mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Produktfraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und das erhaltene und gereinigte Produkt (**4b**) analysiert.

(2S,3S,4R)-*N*-Hexanoyl-phytosphingosin **4b**:

**Ausbeute:** 2,92 g (7,0 mmol); 58,4 %

**Summenformel:** C<sub>24</sub>H<sub>49</sub>O<sub>4</sub>N; relative Molekülmasse: M = 415 g mol<sup>-1</sup>



**Abbildung 15:** Nummerierung der Verbindung **4b** für die spektroskopische Auswertung

**GC-MS:** *m/z* (% Rel. Int.) (EI): 703 (1), 401 (10), 302 (60), 299 (15), 204 (100)

**EA:** (Spuren vom Restlösungsmittel - Laufmittel)

	C [%]	H [%]	N [%]
<b>theor.:</b>	69,35	11,88	3,37
<b>exp.:</b>	61,08	10,44	2,31

**IR** (KBr):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3338 (s) (ν NH, OH), 2956 (w), 2918 (s), 2850 (s) (ν CH), 1735 (w), 1630 (w) (ν CO), 1545 (w) (ν NH), 1468 (w) (ν CH), 1070 (w) (ν CO)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.8 (t, 3 H, CH<sub>3</sub>, H-18), 1.2 (x, 24 H, CH<sub>2</sub>, H-6-17), 1.4 (x, 2 H, CH<sub>2</sub>), 1.6 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>, H-5), 2.2 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>, H-2'), 3.6, 3.7, 3.8 (m, H, OH), 4.15 (m, 1 H, CH-NH, H-2), 4.2 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, H-2'), 6.5 (d, 1 H, NH)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ = 12.0/12.1 (CH<sub>3</sub>, C-6'/C-18), 23.0/23.1 (CH<sub>2</sub>, C-5'/C-17), 23.2, 25.0, 26.0, 28.9, 29.0, 31.0, 31.5, 33.0, 36.0 (CH<sub>2</sub>), 54.0 (CH-NH, C-2), 62.0 (CH<sub>2</sub>OH, C-1), 73.0 (CHOH, C-4), 75.0 (CHOH, C-3), 174.0 (C(=O)NH, C-1')

Die Zuordnung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C- Signale der Verbindung **4b** wird durch Aufnahme von (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) COSY-NMR-Spektren gesichert.

### 3.3 Präparation der Keratinozyten für die Zytotoxizitätsanalyse

Die isolierten Keratinozyten werden aus menschlichem Gewebe (H 608; Brust, weiblich 47 Jahre) am Institut für klinische Chemie am Uniklinikum Regensburg durch die Abteilung Klinische Chemie gewonnen und zur Verfügung gestellt. Die Keratinozyten werden im KGM (Keratinocyte Growth Medium) bis zur Konfluenz mikroskopisch beobachtet. Anschließend werden die synthetisierten Testsubstanzen in Ethanol gelöst, in das KGM gegeben (Gesamtvolumen 220 ml) und in zwei unabhängigen Zeiträumen (Tabelle 5: Keratinozyt Typ 1, Keratinozyt Typ 2) für jeweils 24 und 96 Stunden mit den Keratinozyten (Konzentrationen siehe Tabelle 5) in Kontakt gebracht. Als Standards werden die Verbindungen Natriumlaurylsulfat (SDS) und Retinol in beiden Versuchen verwendet. Die beiden Kontrollen 1 und 2 werden mit den gleichen Mengen an Ethanol versetzt wie die Testsubstanzen. Es wird jeweils ein Ansatz der Zelllinie H 608 mit allen Testsubstanzen jeder Konzentration analysiert.

**Tabelle 5:** Übersicht der Konzentrationen der Testsubstanzen und Standards für die zytotoxischen Bestimmungen der Keratinozyten Typ 1 und Keratinozyten Typ 2

Substanz	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3
<b>Konzentration der Testsubstanzen und Standards (Keratinozyt Typ 1)</b>			
SDS	25 µM	50 µM	250 µM
Retinol	1 µM	5 µM	25 µM
Phytosphingosin (2)	1 µM	5 µM	25 µM
<i>N</i> -Salicyloyl- phytosphingosin (4a)	1 µM	5 µM	25 µM
<i>N</i> -Stearoyl- phytosphingosin (4c)	1 µM	5 µM	25 µM
<b>Konzentration der Testsubstanzen und Standards (Keratinozyt Typ 2)</b>			
SDS	25 µM	125 µM	250 µM
Retinol	1 µM	5 µM	25 µM
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin (4d)	1 µM	5 µM	25 µM
<i>N</i> -Hexanoyl- phytosphingosin (4b)	1 µM	5 µM	25 µM

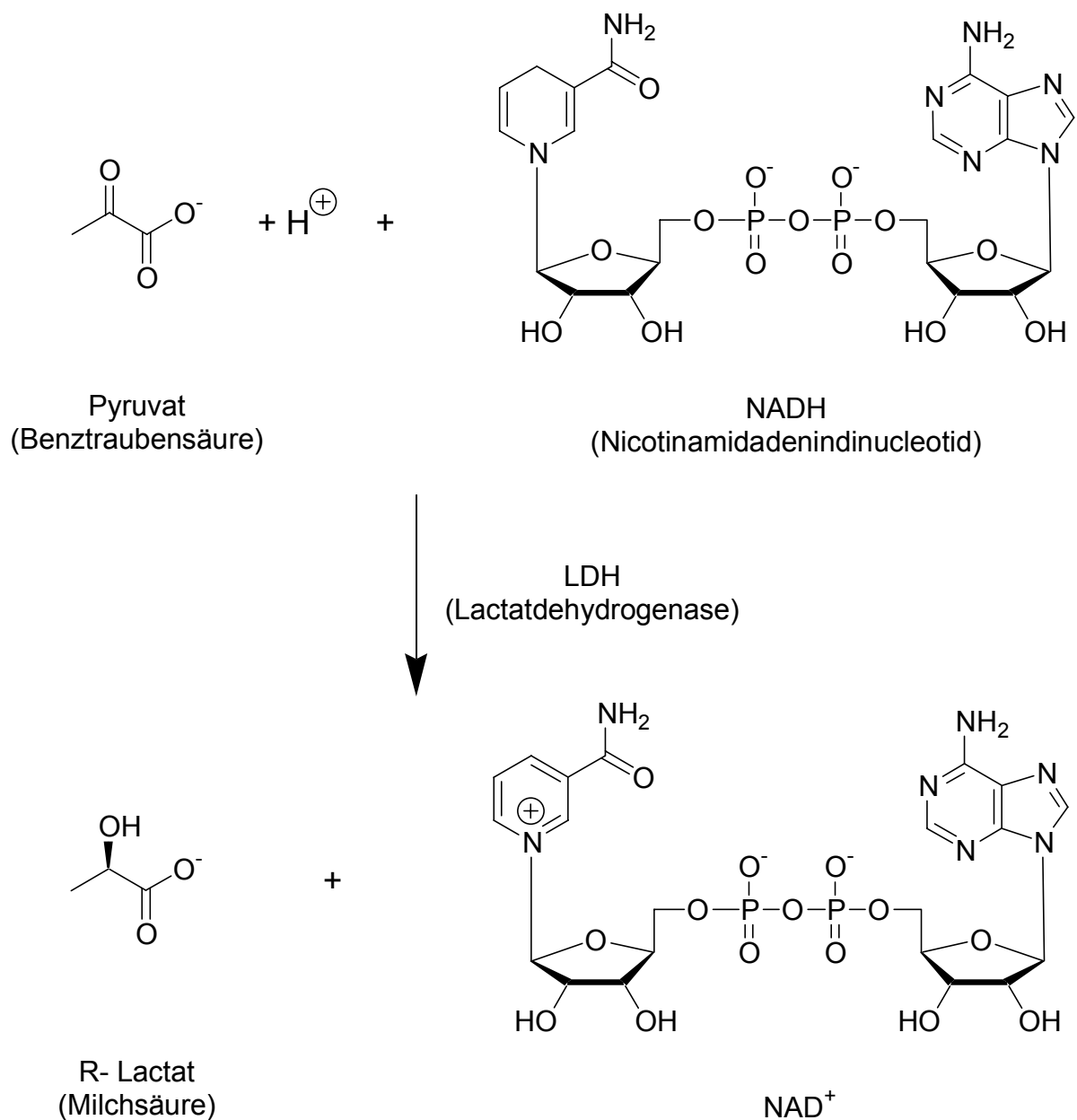
## 3.4 Bestimmung der Zytotoxizität

### 3.4.1 Bestimmung der Aktivität von Lactatdehydrogenase

Das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) ermöglicht die Oxidation des Lactats zum Pyruvat.

#### Reaktion der Lactatdehydrogenase

Die Lactatdehydrogenase (LDH) katalysiert naturgemäß die Bildung sowie die Rückreaktion von Milchsäure aus Pyruvat (Benztraubensäure):



**Abbildung 16:** Reaktion der Lactatdehydrogenase

### Durchführung

Die Testmischung für die LDH-Bestimmung (Kapitel 3.1.1) wird für die Durchführung stets frisch und kurz vor der Messung angesetzt.

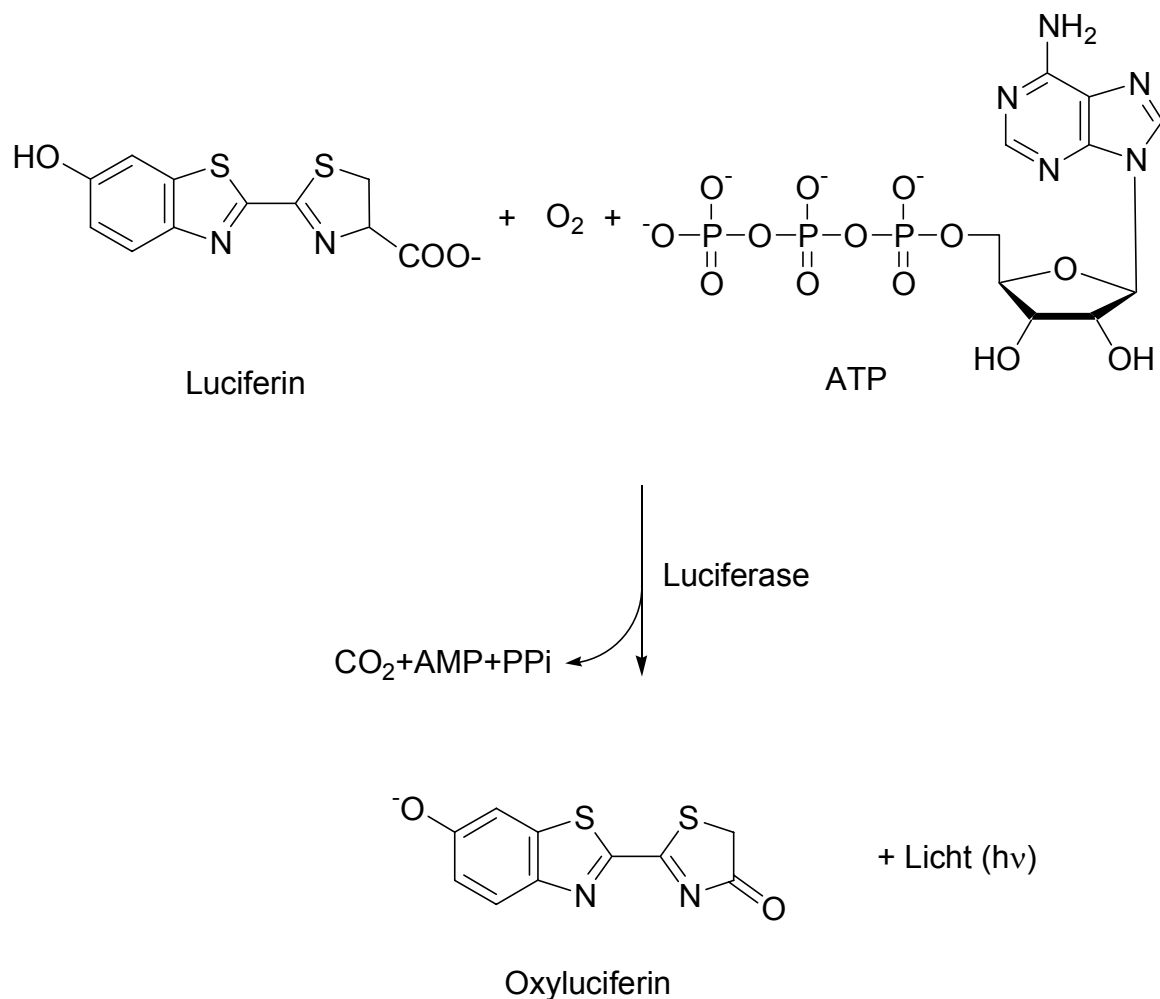
### Messung

Es werden 40  $\mu\text{L}$  des Kulturüberstands der Keratinozyten mit 16  $\mu\text{L}$  Testmischung versetzt und alle 5 Minuten die Extinktion bei 340 nm für 15 Sekunden gemessen. Die photometrisch gemessenen Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.1.1).

### 3.4.2 ViaLight™ Plus

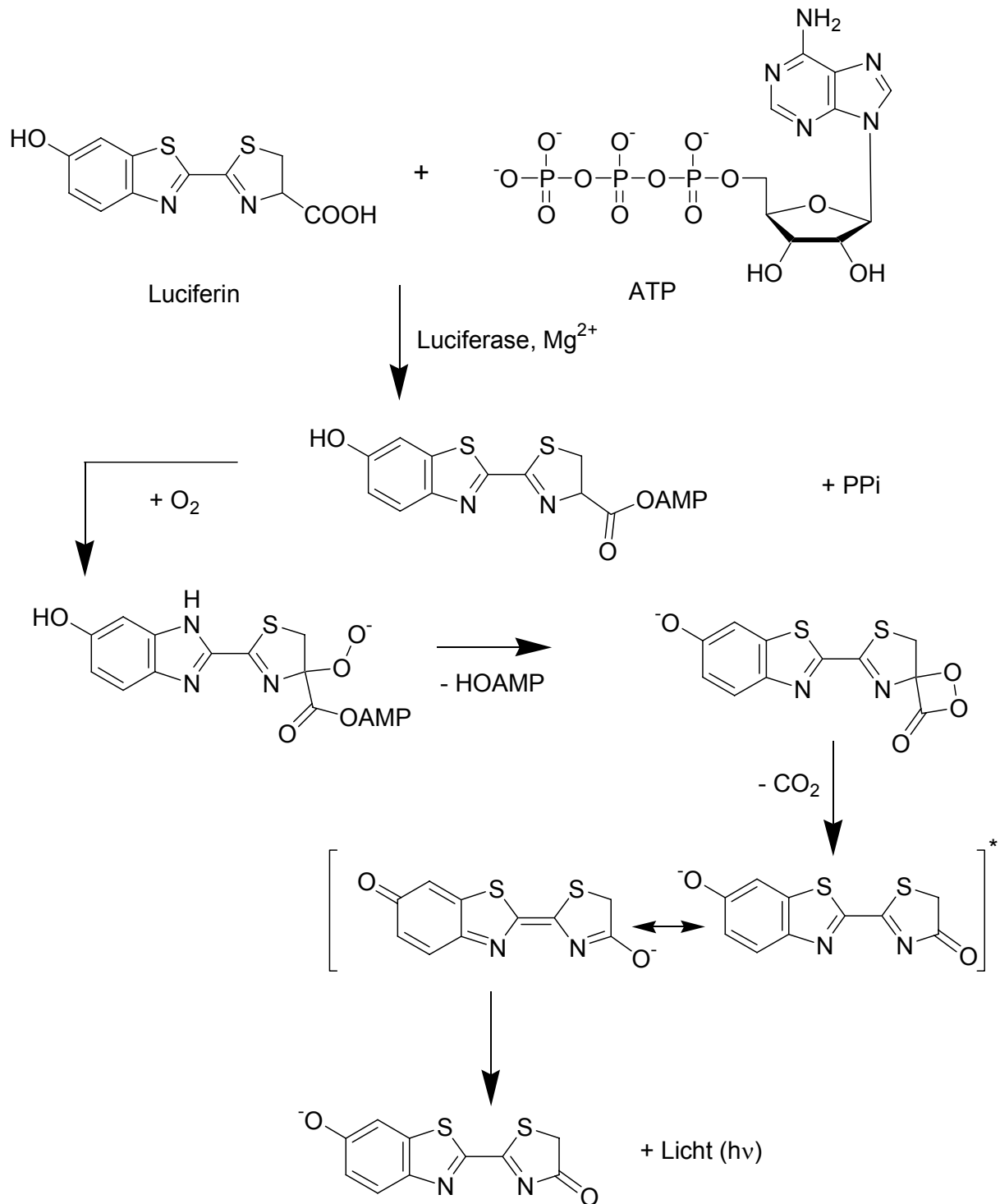
Es wird zelluläres ATP mittels Biolumineszenz gemessen. Das ATP wird als Indikator für die Lebensfähigkeit der Zellen bestimmt.

### Reaktionsschema



**Abbildung 17:** ViaLight™ Plus, ATP Bestimmungsschema





**Abbildung 18:** Reaktionsschritte bei der Biolumineszenzreaktion des Luciferins

Die Durchführung erfolgt laut Vorschrift des ViaLight™ Plus der Firma Cambrex. Zur Analyse werden die Reagenzlösungen des eingesetzten Kits auf Raumtemperatur gebracht. anschließend die ATP-Monitoring-Reagenz-Plus-Lösung in den Assay-Puffer gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Es werden 50 µL von dem Cell-Lysis-Reagenz zugegeben und 10 Minuten stengelassen. Es werden 100 µL vom Zellüberstand abgenommen, 100 µL von AMR-Plus zugegeben und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung bei einer Wellenlänge von 565 nm. Die photometrisch gemessenen Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.1.3).

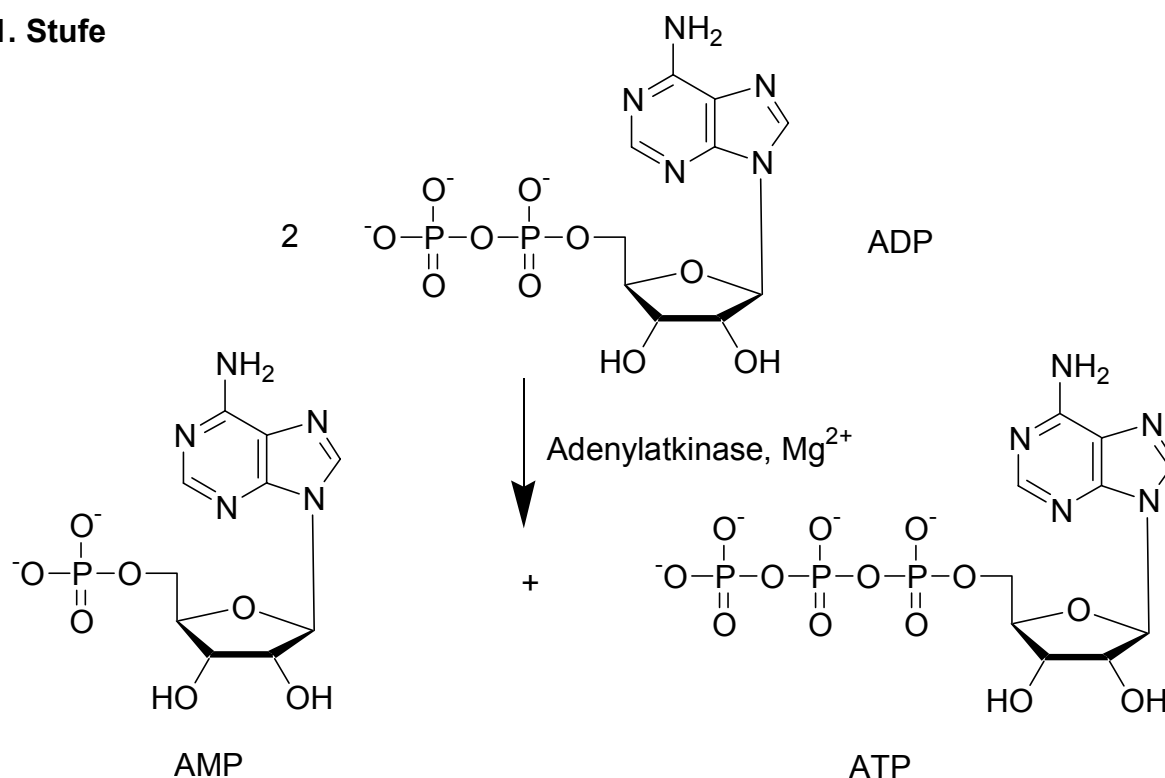
### 3.4.3 ToxiLight™

Es wird das Enzym Adenylatkinase bestimmt, welches bei geschädigten Zellen freigesetzt wird.

#### Prinzip

Die Reaktion beinhaltet zwei Stufen:

##### 1. Stufe



**Abbildung 19:** ToxiLight™, Bestimmungsmethode zur Freisetzung des Enzyms Adenylatkinase (2. Stufe: Abbildung 18)

Die Durchführung erfolgt laut Vorschrift des ToxiLight™ der Firma Cambrex. Zur Analyse werden die Reagenzlösungen des verwendeten Kits auf Raumtemperatur gebracht. Die Lösung AK-Detection-Reagenz (AKDR) wird zum Assay-Puffer gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Es werden 20  $\mu$ L vom Zellüberstand abgenommen, 100  $\mu$ L vom AKDR zugegeben und für 5 Minuten stehen gelassen. Anschließend erfolgt die Bestimmung bei 565 nm am Photometer. Die photometrisch gemessenen Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.1.4).

### 3.5 Präparation der Keratinozyten für die Chipanalyse

Am Institut des Uniklinikums Regensburg werden durch die Abteilung für Klinische Chemie drei Keratinozytentypen (Typ 1: Brust, weiblich, 38 Jahre [H 604], Typ 2: Bauch, weiblich, 41 Jahre [H 614] und Typ 3: Bauch, weiblich, 41 Jahre [H 625]) isoliert und zur Verfügung gestellt. Die isolierten Keratinozyten werden mit den in Ethanol gelösten Testsubstanzen, Konzentrationen (Tabelle 6) wie im Kapitel 3.3 beschrieben, in Kontakt gebracht. Die Verdünnungslösungen enthielten jeweils die gleichen Konzentrationen an Lösungsmittel (Ethanol) wie die Stammlösung. Als Kontrollen dienen nur mit Lösungsmittel behandelte Zellen. Somit sind die beobachteten Effekte nicht auf den Einfluss des Ethanols zurückzuführen, sondern eine Folge der getesteten Substanzen.

**Tabelle 6:** Übersicht der Konzentrationen der Testsubstanzen für die Chipanalyse

Substanzen	Konzentration Tag 1	Konzentration Tag 4
Kontrolle 1	-	-
Kontrolle 2	-	-
Retinol	25 $\mu$ M	25 $\mu$ M
Phytosphingosin ( <b>2</b> )	25 $\mu$ M	25 $\mu$ M
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin ( <b>4d</b> )	25 $\mu$ M	5 $\mu$ M
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )	25 $\mu$ M	25 $\mu$ M
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin ( <b>4c</b> )	25 $\mu$ M	25 $\mu$ M
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> )	25 $\mu$ M	5 $\mu$ M

### 3.6 Mikroskopische Bestimmungen

Die Keratinozyten für die DNA-Chipanalyse werden anhand mikroskopischer Aufnahmen beobachtet, so dass eine optische Veränderung der Zellen durch die Testsubstanzen verfolgt werden kann. Von den eingesetzten Keratinozytentypen H 604, H 614 und H 625 werden jeweils am Tag 0 (unbehandelte Keratinozyten), sowie von jeder mit der Testsubstanz (Wirkstoff) behandelten Zelllinie mikroskopische Aufnahmen gemacht, um eine eventuelle Zellschädigung auszuschließen. Aufgrund des Kontaminationsrisikos werden von jeder

Zelllinie drei kleinere Ansätze parallel isoliert und unter dem Mikroskop betrachtet, jedoch aus Kostengründen nur eine Zelllinie fotografiert.

### **3.7 Expressionsanalyse mittels DNA-Chips**

Die Aufarbeitung der Keratinozyten und die Applikation auf die DNA-Chips erfolgt durch das Institut für Klinische Chemie am Uniklinikum Regensburg. Für die DNA-Chipanalyse wird aus den jeweiligen Keratinozytentypen (H 604, H 614 und H 625) die RNA isoliert und anschließend definierte Mengen entnommen, diese miteinander vereinigt und zur weiteren Analyse aufgearbeitet. Da die menschlichen Keratinozyten nicht identisch sind, erfolgt eine Vereinigung der isolierten RNA-Mengen der jeweiligen Keratinozytenlinie, um einen Durchschnittswert für menschlich isolierte Keratinozyten zu erhalten.

Die Prozessierung der aus dem Probenmaterial isolierten RNA erfolgte nach dem von Affymetrix vorgegeben Protokoll und unter Verwendung der empfehlenden Kits. Die gemessenen Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.3).

### 3.8 Herstellung der Cremeformulierung für die Hautmodelle

Für die Herstellung der Cremeformulierung werden zwei separate Lösungen bereitgestellt.

#### **Lösung 1:**

Es werden 3,0 g TEGO Care 450, 2,0 g TEGIN M, 1,0 g TEGO Alkanol 18, 5,0 g TEGO-SOFT liquid, 14,0 g Paraffinum Perl. sowie 0,2 g der jeweiligen Testsubstanz (Wirkstoff) zusammengegeben und diese Mischung auf 80 °C erwärmt. Dabei ist darauf zu achten, dass sich alle Komponenten lösen.

#### **Lösung 2:**

Für die Testsubstanzen werden 74,8 g Wasser auf 80 °C erwärmt. Bei der Leerformulierung (Kontrolle) werden 75,0 g Wasser auf 80 °C erwärmt.

Die Lösung 2 wird unter Rühren zu der Lösung 1 gegeben und für drei Minuten mit einem Rührstab (Zauberstab) homogenisiert. Die Emulsion wird unter Rühren im Wasserbad auf 30 °C abgekühlt und der pH-Wert kontrolliert, ggf. wird der pH-Wert mit Citronensäure bzw. Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt.

### 3.9 Applikation von Substanzen auf die Hautmodelle

Vergleichswerte für die Applikationsdauer von Testsubstanzen auf Hautmodellen lagen nicht vor. Der Hersteller (Skinethic) empfiehlt für seine Hautmodelle eine maximale Applikationszeit von drei Tagen. Zur Festlegung der Applikationsdauer werden am ersten und nach drei Tagen Leerformulierungen untersucht und diese mit menschlicher RNA verglichen. Anschließend erfolgt am ersten und nach drei Tagen eine weitere Voruntersuchung mit der Verbindung Retinol. Alle Testsubstanzen werden dreifach bestimmt, d.h. jede Substanz wird auf drei Hautmodelle appliziert. Anhand dieser Voruntersuchungen wird eine Applikationszeit für die nachfolgenden Versuchsreihen (Wirkstoffe) festgelegt.

Die Hautmodelle werden von der Firma Skinethic (Frankreich) bezogen. Nach Erhalt werden die Hautmodelle in 6-well-Zellkulturplatten mit je 1200 µL Maintenance-Medium der Firma Skinethic überführt. Die Kulturen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht präinkubiert. Die Präinkubationsphase dient der Regeneration der Hautmodelle nach dem Transport. Nach 24 Stunden werden etwa 12 mg der Cremeformulierung (wie unter Kapitel 3.8 hergestellt) mit einem sterilen Tupfer auf die Hautmodelle gleichmäßig appliziert, so dass die Oberfläche der Kulturen schwach bedeckt ist. Von dem Kulturmedium der Hautmodelle wird die LDH-Bestimmung und die Interleukin-8-Bestimmung bei der Degussa in Krefeld durch die Abteilung LTÖ durchgeführt. Anhand dieser Daten kann eine eventuelle Schädigung der Hautmodelle durch die Testsubstanzen bestimmt werden. Anschließend werden die Hautmodelle bei 37 °C in einen Brutschrank gegeben. Nach dem Ende der Applikationszeit werden die Hautmodelle in flüssigen Stickstoff (-195 °C) überführt.

### **3.9.1 Präparation von RNA aus den Hautmodellen**

Die Isolierung der gesamt-RNA aus den Hautmodellen wird mittels des *RNeasy Mini Kits* durchgeführt. Zur Analyse werden die eingefrorenen Hautmodelle auf Raumtemperatur erwärmt und mit 1 ml Qiazollösung versetzt. Im Tissuelyser wird das Hautmodell für 5 min bei 16.000 Hertz mit einer 5 mm Stahlkugel homogenisiert. Die Lösung wird für 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend mit 200 µL Chloroform versetzt. Diese Lösung wird für 15 s gemischt und erneut 3 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Suspension wird 15 min bei 4 °C und 12.000 U/min zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Eppendorf-Cap gegeben. Die abgenommene Menge wird mit dem gleichen abgenommenen Volumen (ca. 600 µL) Ethanol (70 %) versetzt. Es werden 700 µL Flüssigkeit abgenommen, auf eine RNeasy mini column überführt und 15 s bei 13000 U/min zentrifugiert, die Flüssigkeit kann verworfen werden. Mit dem Rest der Lösung wird gleich verfahren. Anschließend werden 700 µL Puffer RW1 zugegeben und 15 s bei 13.000 U/min zentrifugiert, die Flüssigkeit kann verworfen werden. Die Säulen werden auf ein neues Tube (2,2 ml) gegeben und mit 500 µL Puffer RPE versetzt und erneut 15 s bei 13000 U/min zentrifugiert, die Flüssigkeit wird verworfen. Nun werden 500 µL Puffer RPE zugegeben, 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, die Transfersäulen auf 1,5 ml Eppendorf-Caps (2 ml) gesetzt und mit 50 µL RNase-free Wasser versetzt, anschließend für eine Minute bei 13.000 U/min zentrifugiert. Zur Messung werden 10 µL RNA-Lösung mit 90 µL Wasser versetzt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine Absorption ( $A_{260}$ ) von 1,00 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA,

33 µg/ml kurzer, einzelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Man bestimmt zusätzlich die Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ). Über den Quotienten  $Q_{NS} = A_{260}/A_{280}$ , der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte, kann man auf die Reinheit schließen. Kleinere Werte weisen auf eine Kontamination der Probe mit Proteinen, größere Werte auf eine Kontamination der Probe mit Phenol hin, welche die nachfolgenden Schritte behindern können. Die restlichen 40 µL Lösung werden aufgeteilt (je 10 µL) und im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

### 3.9.2 Erststrangsynthese

Mit dem First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit für die RT-PCR wird die reverse Transkription durchgeführt. Es werden jeweils 100 ng RNA von den Proben (bzw. Referenz: RNA aus Haut) abgenommen, mit 1 µL random hexamer (50 µM) und 1 µL DEPC-Wasser versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 10 µL gebracht. Diese Lösung wird bei 65 °C für fünf Minuten inkubiert und anschließend für eine Minute auf Eis gelagert. Zur Prüfung auf systematische Fehlerquellen wird Wasser als Blindprobe in allen Untersuchungen eingesetzt. Anschließend wird zu jeder Lösung 10 µL cDNA-Synthesis-Mix (Tabelle 7) gegeben, gemischt, die Lösung 10 Minuten bei 25 °C, 50 Minuten bei 50 °C und 5 Minuten bei 85 °C temperiert und danach auf Eis gelagert.

Zu jeder Lösung wird 1 µL RNase H gegeben und 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Lösung kann nun bei -80 °C eingefroren oder für eine PCR-Messung eingesetzt werden.

**Tabelle 7:** Herstellung des cDNA Synthesis Mix (Lagerung bei -20 °C) für die Erststrangsynthese

Komponente	Volumen [µL]
10* RT buffer	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4
0,1 M DTT	2
RNaseOUT (40 U/µL)	1
SuperScript III RT (200 U/µL)	1



**PCR**

Es werden 1,5 µL Templat (cDNA) entnommen und folgende Lösungen zugegeben:

**Tabelle 8:** Templat-Zusammensetzung für die PCR, Primer (Tabelle 9 und 10)

Substanz	Volumen [µL]
2* SYBR Green MasterMix	25
Primer-F (100 pmol / µL)	0,15
Primer-R (100 pmol / µL)	0,15
RNase free Wasser	23,2

Initialdenaturierung: 15 Minuten bei 95 °C

Amplifikation:

Denaturierung: 15 s bei 94 °C

Annealing: 30 s bei 50 °C

Extension: 30 s bei 72 °C

Bei einer Zahl von 44 Zyklen mit anschließender Schmelzpunktbestimmung betrug die Dauer der kompletten PCR 2,5 Stunden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Opticon Monitor Analysis Software, Version 1.05 von der Firma MJ Research.

**Tabelle 9:** Verwendete Oligonucleotide der Firma MWG (Forward Primer)

Forward Primer	Sequenz (5' - 3')
ARP-F2	TTGAAATCCTGAGTGATGT
ACTB-F	ACTGGAACGGTGAAGGTGACA
KRT 5-1156F	ATCTCTGAGATGAACCGGATGATC
KRT 10-F	TGGTTCAATGAAAAGAGCAAGGA
TGM 1-F	CCCCCGCAATGAGATCTACA
Profila-99F	GAAGGAACTTCTGGAAAACCAATTT
LOR-965F	CTACCTGGCCGTCCAAATAGATC
SKALP-F	CATGAGGGCCAGCAGCTT
AQP 3	GGCTGTATTATGATGCAATCTGGC
MMP 1	CAACAATTTCAAGAGAGTACAACCTTACATC
IVL	CTGTGAGTCTGGTTGACAGTAGC
COL 7	TATGACCCACGGACAGAGTTC

**Tabelle 10:** Verwendete Oligonucleotide der Firma MWG (Reverse Primer)

Reverse Primer	Sequenz (5' - 3')
ARP-F2	TGACCAGCCCAAAGGAGAAG
ACTB-F	AGGGACTTCCTGTAACAACGCA
KRT 5-1156F	CAGATTGGCGCACTGTTTCTT
KRT 10-F	GGGATTGTTTCAAGGCCAGTT
TGM 1-F	ATCCTCATGGTCCACGTACACA
Profila-99F	CTCAGTGAAGTCAATTTTCTTGTTGTG
LOR-965F	AACCTCGGGTAGCATCATGAGA
SKALP-F	TTTAACAGGAACTCCCGTGACA
AQP 3	GTGCCTATGAACTGGTCAAAGAAG
MMP 1	GGGAACGTCCATATATGGCTTGG
IVL	GGAGGCAGTGGAGTTGGCTG
COL 7	GATGCAGACCTTGGGGACAC

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Berechnung der log $P_{O/W}$ -Werte mittels der Programme Daylight und Syrres

Nach Eingabe der Strukturformel des zu bestimmenden Moleküls wird der log  $P_{O/W}$  berechnet. Im Einzelnen ergeben sich für die synthetisierten Substanzen folgende log  $P_{O/W}$ -Werte:

**Tabelle 11:** Übersicht der berechneten log  $P_{O/W}$ -Werte der Test- und Vergleichssubstanzen

Verbindung	log $P_{O/W}$ (Daylight)	log $P_{O/W}$ (Syrres)	log $P_{O/W}$ experimentell
SDS	1,52	1,69	1,60 [Hansch et al., 1995]
Retinol	6,63	7,62	-
Phytosphingosin ( <b>2</b> )	5,51	4,21	-
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> )	7,39	6,19	-
Hexansäure (C6) ( <b>1b</b> )	1,92	2,05	1,92 [Hansch et al., 1995]
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )	8,05	6,11	-
Essigsäure	-0,19	0,09	
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin ( <b>4d</b> )	5,89	4,70	
Stearinsäure (C18) ( <b>1c</b> )	8,27	7,94	8,23 [Sangter, 1993]
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin ( <b>4c</b> )	14,93	12,50	-

### 4.1.1 Bewertung der log $P_{o/w}$ -Ergebnisse

Die Aufgaben und Ziele der Kosmetik und mit ihr auch der Wirkstoffkosmetik ergeben sich weitgehend aus der Definition der kosmetischen Mittel, wie sie der Gesetzgeber in Artikel 1 der ursprünglich in 1976 erlassenen EG-Kosmetik-Richtlinie (EG-KRL) festgeschrieben hat. Von kosmetischen Mitteln wird gefordert, dass sie gezielt wirken und völlig unbedenklich für die Gesundheit des Verbrauchers sind. Zumindest gibt es in der EU, anders als in den USA, keine aus den Gesetzen abzuleitende Beschränkung der Wirkungstiefe innerhalb der Haut. Der Gesetzgeber spricht zwar von einer äußerlichen Anwendung – mit Ausnahme der Mundhöhle –, an keiner Stelle wird aber eine Beschränkung hinsichtlich der Wirkungstiefe in der Haut formuliert [Umbach, 2004].

In dieser Arbeit wird die Penetrationsfähigkeit der synthetisierten Stoffe für die Hautmodellanalyse anhand ihres Verteilungskoeffizienten ( $\log P_{o/w}$ ) abgeschätzt. Wie bereits im Kapitel 2.7.3 beschrieben, zeigen Verbindungen mit  $\log P_{o/w}$ -Werten unterhalb von 4 gute Penetrationseigenschaften. Anhand der ermittelten Werte ist davon auszugehen, dass eine Penetration bei den Hautmodellversuchen der langkettigen Verbindung *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) nur bedingt stattfinden wird. Des Weiteren kann anhand der Daten davon ausgegangen werden, dass die Sphingoidbase Phytosphingosin (**2**) sowie das *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) besser in die Haut penetrieren werden. Vergleichbar sind die  $\log P_{o/w}$  Werte des *N*-Hexanoyl-phytosphingosins (**4b**) mit denen des *N*-Salicyloyl-phytosphingosins (**4a**).

## 4.2 Penetrationsuntersuchungen

Erste Studien zum Penetrationsverhalten an Schweinehaut wurden am Institut Dr. Schrader Creachem GmbH durch die mikrobiologische Abteilung nach der OECD, Guideline 428 durchgeführt [Farwick, 2005]. In der vorliegenden Studie wurde anhand von Cremeformulierungen ein Gemisch von Ceramid III und Phytosphingosin (**2**) sowie ein Gemisch von *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) und *N*-Hexanoyl-sphingosin als Testsubstanz appliziert. Die anschließende Wiederfindungsanalyse in der Haut ergab für das Phytosphingosin (**2**) 10 % und für das *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) 9 %. Daraus folgt, dass Phytosphingosin (**2**) und *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) vergleichbare Penetrations-

eigenschaften besitzen. Hieraus kann abgeleitet werden, dass eine Abschätzung zwischen Penetration und  $\log P_{O/W}$ -Berechnung möglich ist.

## 4.3 Zytotoxizitätsergebnisse

Die Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden im Kapitel 3.4 beschrieben. Anhand der Auswertung dieser Zytotoxizitätsdaten werden die Substanzkonzentrationen für die Microarrayanalyse festgelegt. Die aus menschlichem Gewebe isolierten Keratinozyten werden in einem Kulturmedium mit den jeweiligen Testsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen über die Dauer von einem und vier Tagen in Kontakt gebracht. In dem jeweiligen Zellüberstand werden die LDH-, die ATP- und Adenylatkinase-Freisetzung im Vergleich zu zwei Kontrollsubstanzen (Retinol und SDS) bestimmt. Die Bestimmung der Zu- bzw. Abnahme im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ( $0 \mu\text{M}$ ) zeigt ein Maß der Zytotoxizität der Testsubstanzen in den verwendeten Konzentrationen an. In den nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 20 bis Abbildung 31) der Resultate ist die erste Säule das Ergebnis für die Kontrolle. Die Kontrolle enthält die äquivalente Menge an Ethanol ( $0 \mu\text{M}$  bezogen auf die Testsubstanz).

Im nachfolgenden Abschnitt werden die einzelnen Resultate der zytotoxischen Untersuchungen für eine Testsubstanz entsprechend der Applikationsdauer am ersten Tag (24 Stunden) und am vierten Tag (96 Stunden) zusammenfassend beschrieben. In den entsprechenden Abbildungen sind die Daten einzeln dargestellt.

Die Testsubstanzen und das Retinol werden in einer Konzentrationsreihe von 1, 5 und  $25 \mu\text{M}$  eingesetzt. Die Kontrollsubstanz SDS wird in der ersten Testreihe in folgenden Konzentrationen von 25, 50 und  $250 \mu\text{M}$  bzw. in der zweiten Testreihe von 25, 125 und  $250 \mu\text{M}$  eingesetzt.

Wie beschrieben, werden im Rahmen dieser Untersuchung Keratinozyten menschlicher Herkunft benötigt. Aufgrund des Arbeitsumfangs konnten nicht alle fünf Testsubstanzen parallel bearbeitet werden. Damit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben ist, wird die gleiche Zelllinie H 608 verwendet, wobei in der zweiten Testreihe die Zellen zwei Tage älter sind, als die der ersten Testreihe. Die zytotoxischen Ergebnisse sind im Anhang (Kapitel 9.1) aufgeführt.

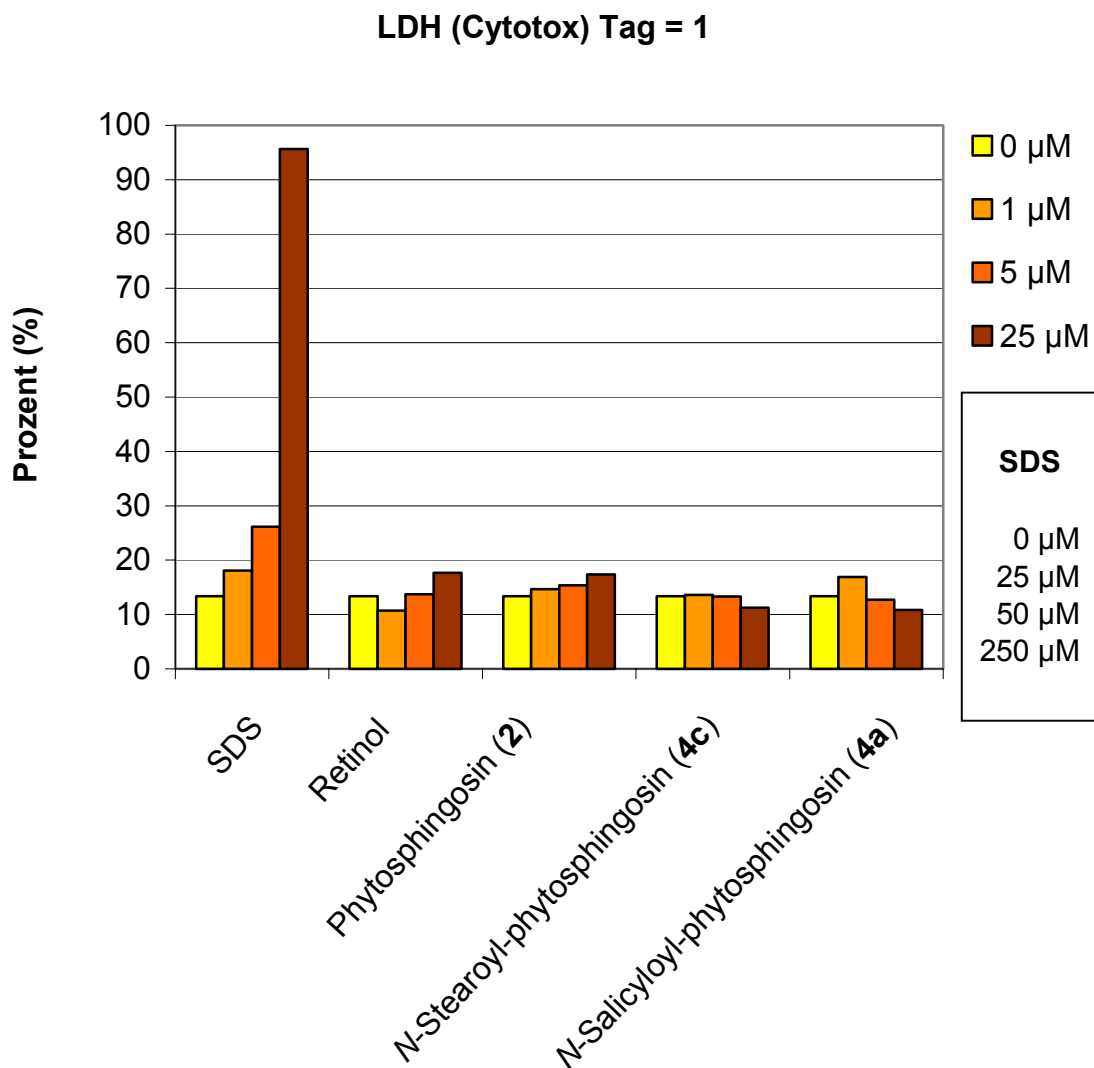
### 4.3.1 Auswertung der LDH-Freisetzung

Es ist aus der Literatur bekannt, dass durch Kontakt mit der Substanz SDS Zellschädigungen und Auslösungen irritativer Hautreaktion bis zur Erzeugung von akuten und chronischen Kontaktekzemen eintreten. Dies beruht im Wesentlichen auf dem Herauslösen der Oberflächenlipide [Effendy et al., 1996]. Die Verwendung von SDS als Kontrollsubstanz beruht auf seiner gut untersuchten Wirkung im *Stratum corneum*, welche durch eine Anzahl von Studien in der Literatur dokumentiert ist [Agner, 1992; Lee und Maibach, 1995]. Eine Messgröße für Zellschädigung ist die LDH-Freisetzung. Wie im Allgemeinen Teil (Kapitel 2.6) beschrieben, ist die steigende Anzahl der avitalen Zellen proportional der erhöhten LDH-Aktivität im Zellüberstand.

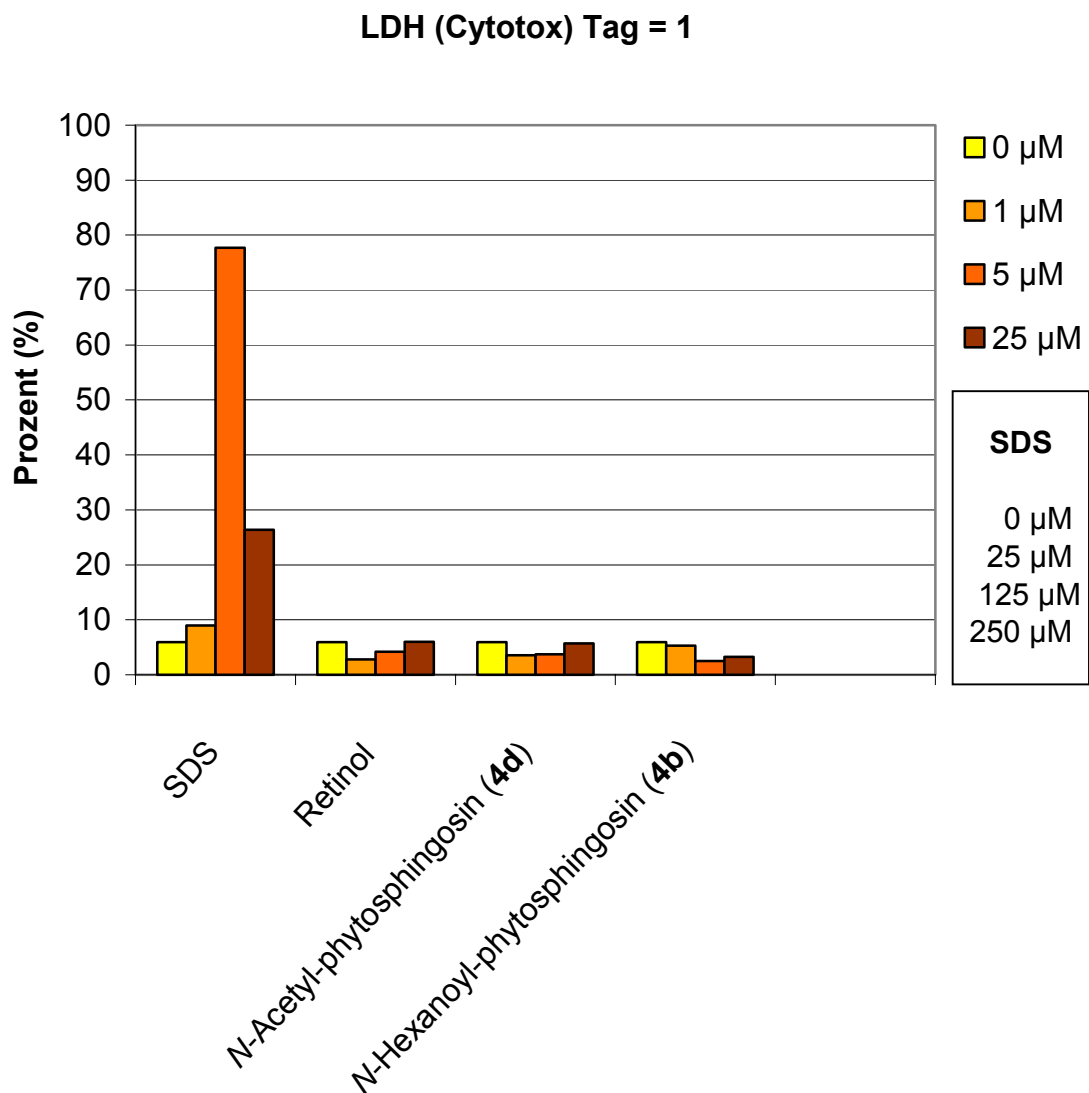
Am ersten Tag zeigt die Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  der SDS-Kontrollsubstanz in der Zelllinie H 608 eine deutliche Zunahme der LDH-Konzentration (Abbildung 20). Dieses Ergebnis wird auch im zweiten Teil Serie Typ 2 ab einer Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  (Keratinozyt Typ 2) bestätigt (Abbildung 21). Es ist aber zu beachten, dass in der zweiten Serie nach Behandlung mit einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  deutlich weniger LDH im Zellüberstand bestimmt wird (Abbildung 21). Aufgrund der zwei Tage Differenz, die zwischen dem Beginn der Testserie Typ 2 und Typ 1 liegt, ist davon auszugehen, dass die Zellen nicht mehr so aktiv sind wie am ersten Tag. Die zu untersuchenden Spingolipidderivate zeigen keine messbare LDH-Zunahme im Zellüberstand.

Im Zellüberstand wird für die SDS-Kontrollsubstanz in der Testserie Typ 1 und Typ 2 am vierten Tag bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  eine geringere LDH-Konzentration bestimmt, bezogen auf die vorhergehende Konzentrationsstufen (50  $\mu\text{M}$  bzw. 125  $\mu\text{M}$ ) (Abbildung 22 und 23).

Die Zunahme der LDH-Konzentration bei den Sphingolipidderivaten *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) (Abbildung 23) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) (Abbildung 22) bei der Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  sind signifikant. Die übrigen Konzentrationen aller Testsubstanzen liegen im Bereich der Kontrollen. Daraus ist zu schließen, dass für die Verbindungen *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) die Einsatzkonzentrationen für weitere Untersuchungen verringert werden sollten.

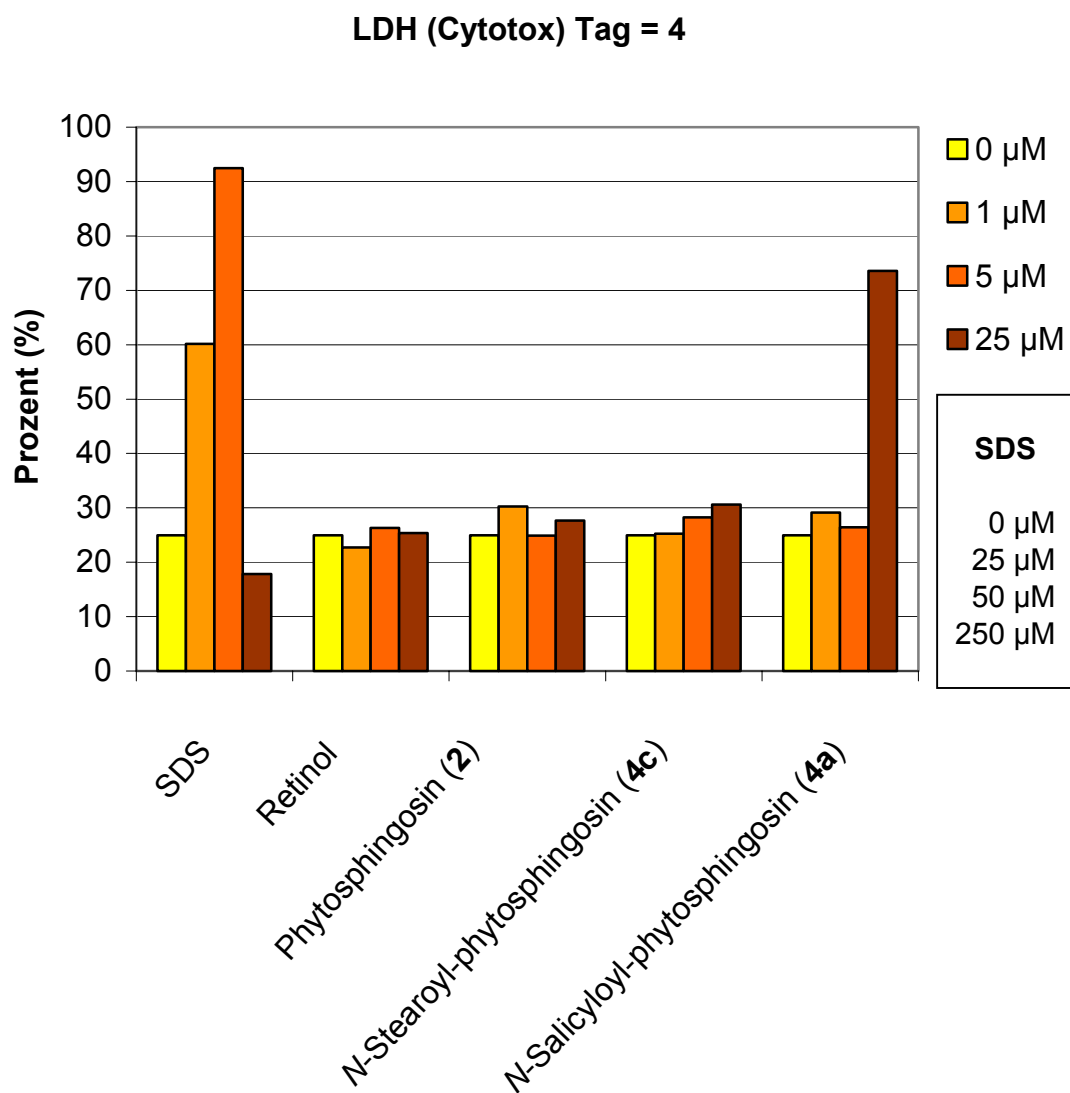


**Abbildung 20:** Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Freisetzung von LDH in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am ersten Tag

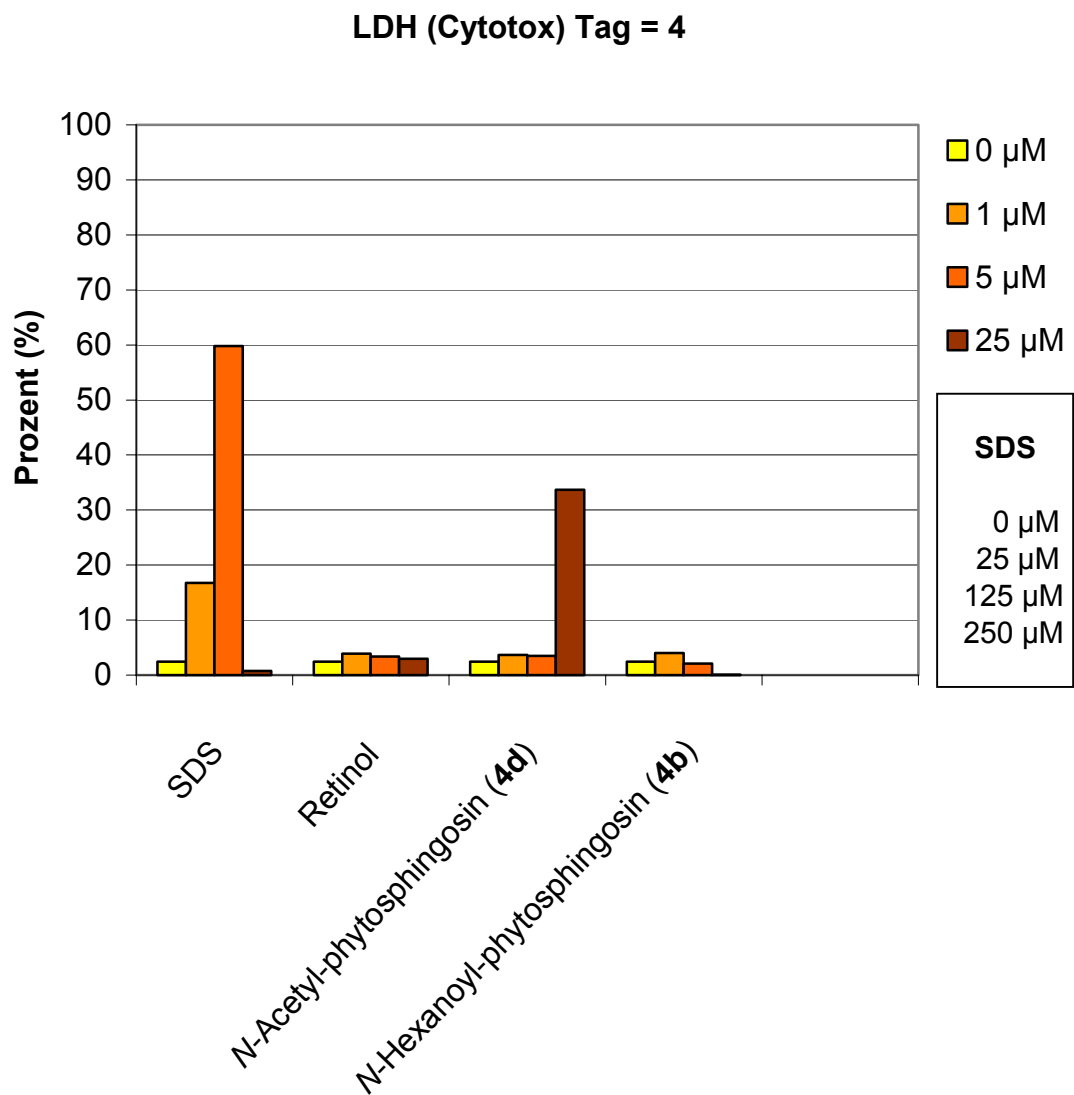


**Abbildung 21:** Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Freisetzung von LDH in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am ersten Tag





**Abbildung 22:** Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Freisetzung von LDH in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am vierten Tag

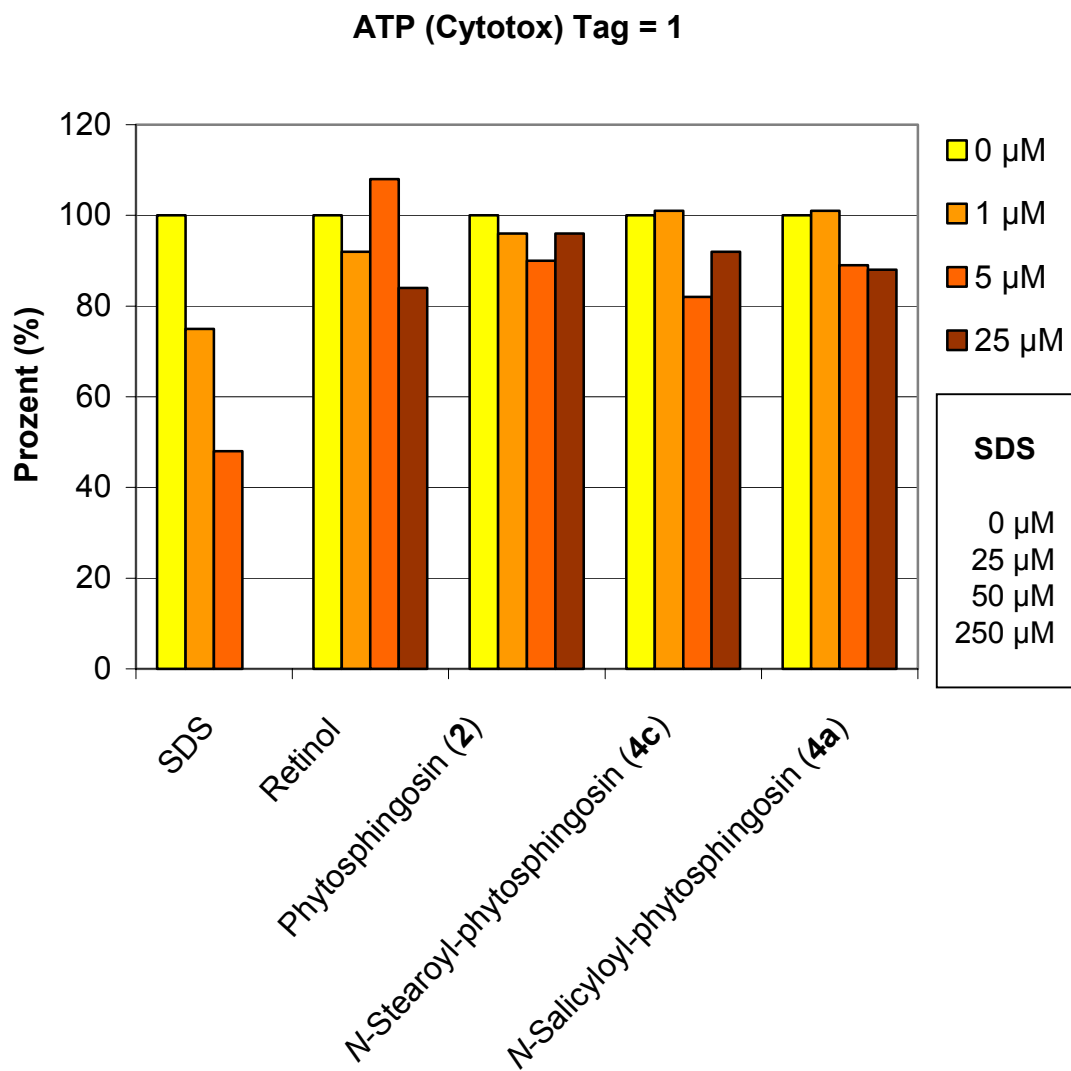


**Abbildung 23:** Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Freisetzung von LDH in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am vierten Tag

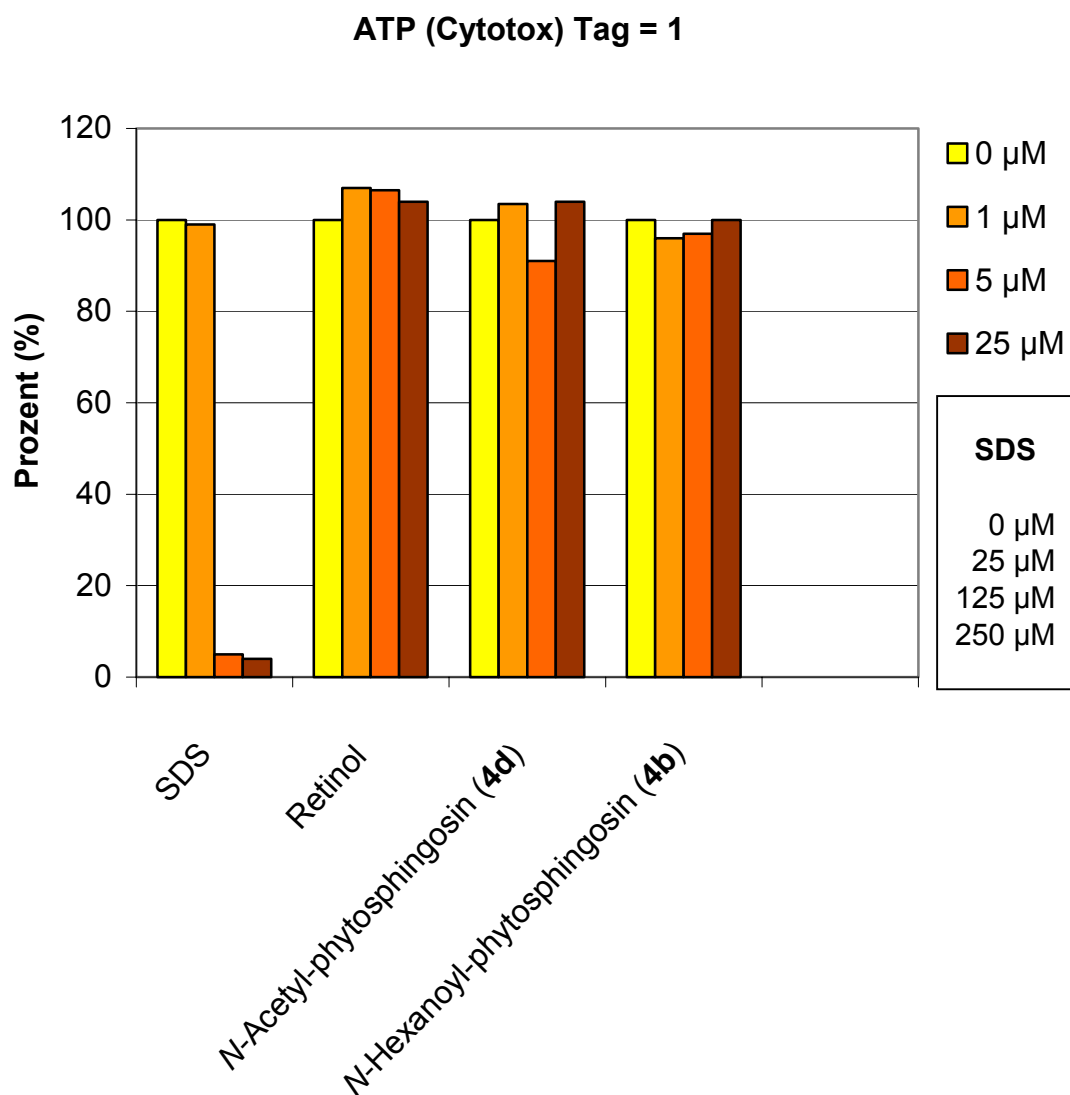
### 4.3.2 ViaLight™ Plus

In dieser Zytotoxizitätsbestimmung wird die Vitalität der Zellen bestimmt, indem die Abnahme der ATP-Konzentration mittels Biolumineszenz gemessen wird. Die Intensität des emittierten Lichtes ist linear zur ATP-Konzentration.

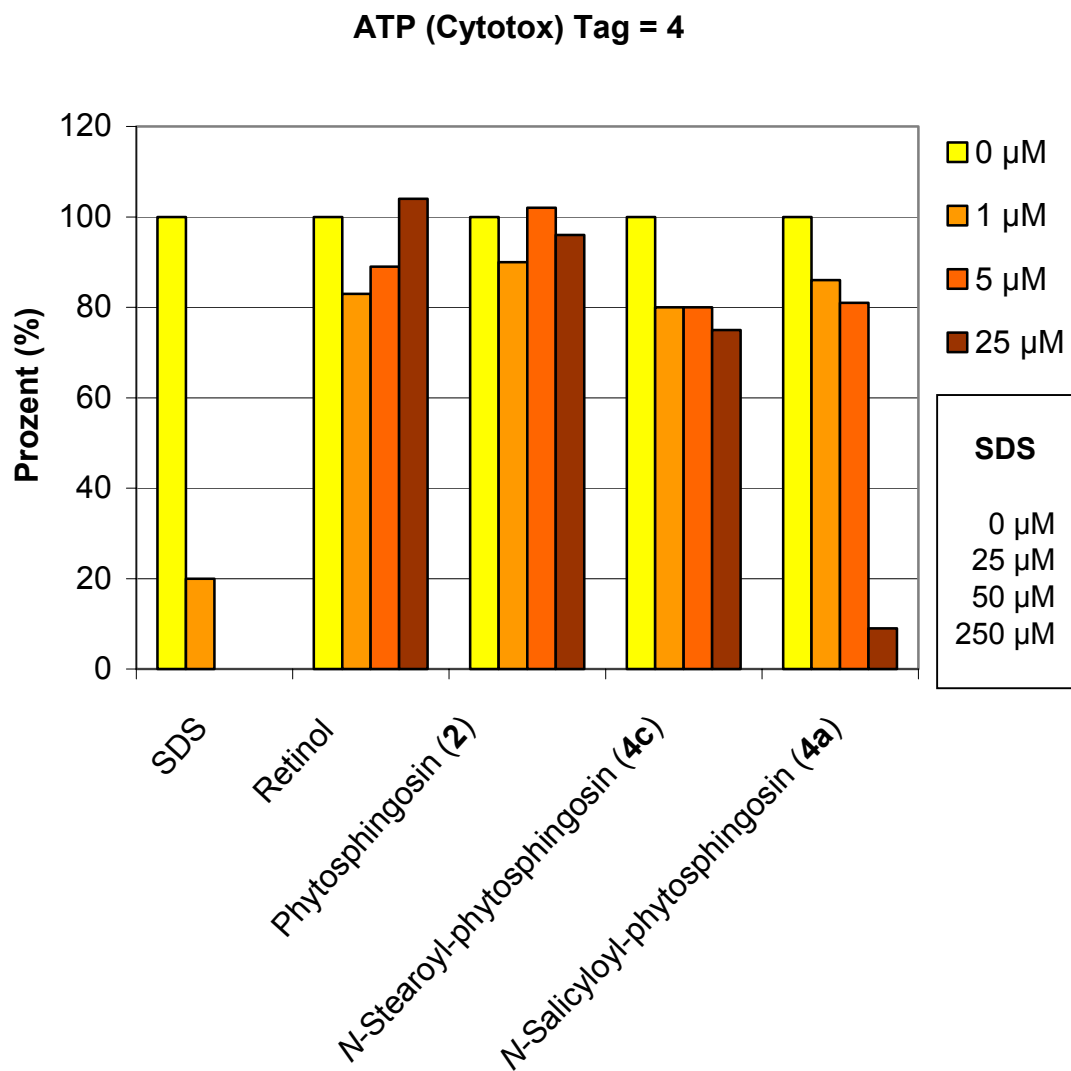
Da die Kontrollsubstanz SDS eine Zellschädigung herbeiführt, sollten die ATP-Konzentrationen im Zellüberstand abnehmen, je höher die eingesetzte Konzentration an SDS ist. Dies wird in den Ergebnissen der Untersuchung Typ 1 und Typ 2 bestätigt (Abbildung 24 bis Abbildung 27). Auffällig hierbei ist, dass es mit zunehmender Dauer der Einwirkung zu einer deutlichen Abnahme der gemessenen ATP-Konzentration kommt. Somit ist ATP am vierten Tag in der Serie Typ 1 nur noch bei der Konzentration von 25  $\mu$ M nachweisbar. Die ATP-Niveaus im Zellüberstand der spingolipidbehandelten Keratinozyten liegen durchgehend im Bereich der Kontrollen. Lediglich bei der Konzentration von 25  $\mu$ M für die Verbindung *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) (Abbildung 27) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) (Abbildung 26) ist die gemessene ATP Konzentration deutlich geringer als bei den Vergleichswerten.



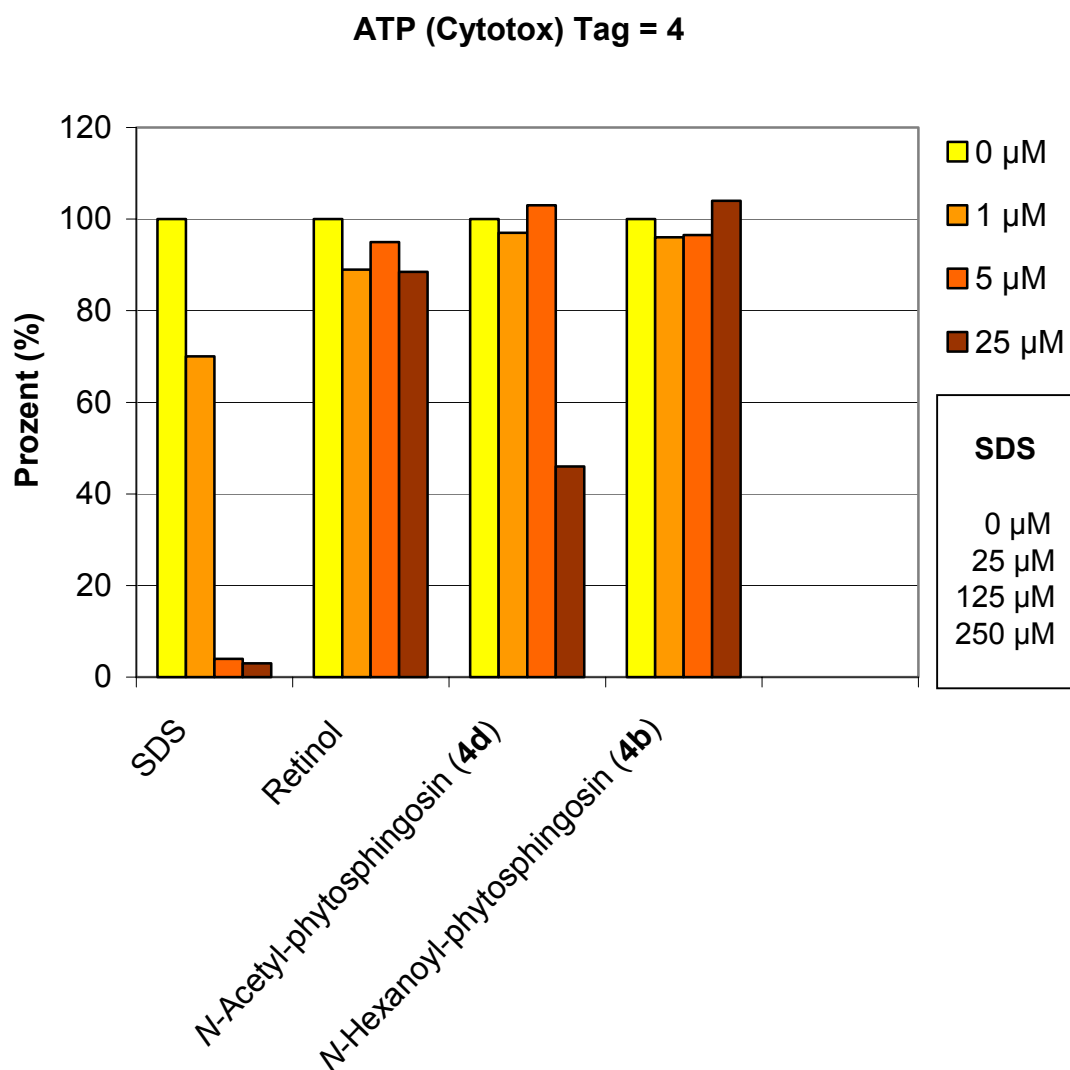
**Abbildung 24:** Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Interzelluläres ATP-Niveau am ersten Tag in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration



**Abbildung 25:** Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Interzelluläres ATP-Niveau am ersten Tag in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration



**Abbildung 26:** Keratinozy Typ 1 Zelllinie H 608: Interzelluläres ATP-Niveau am vierten Tag in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration



**Abbildung 27:** Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Interzelluläres ATP-Niveau am vierten Tag in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration

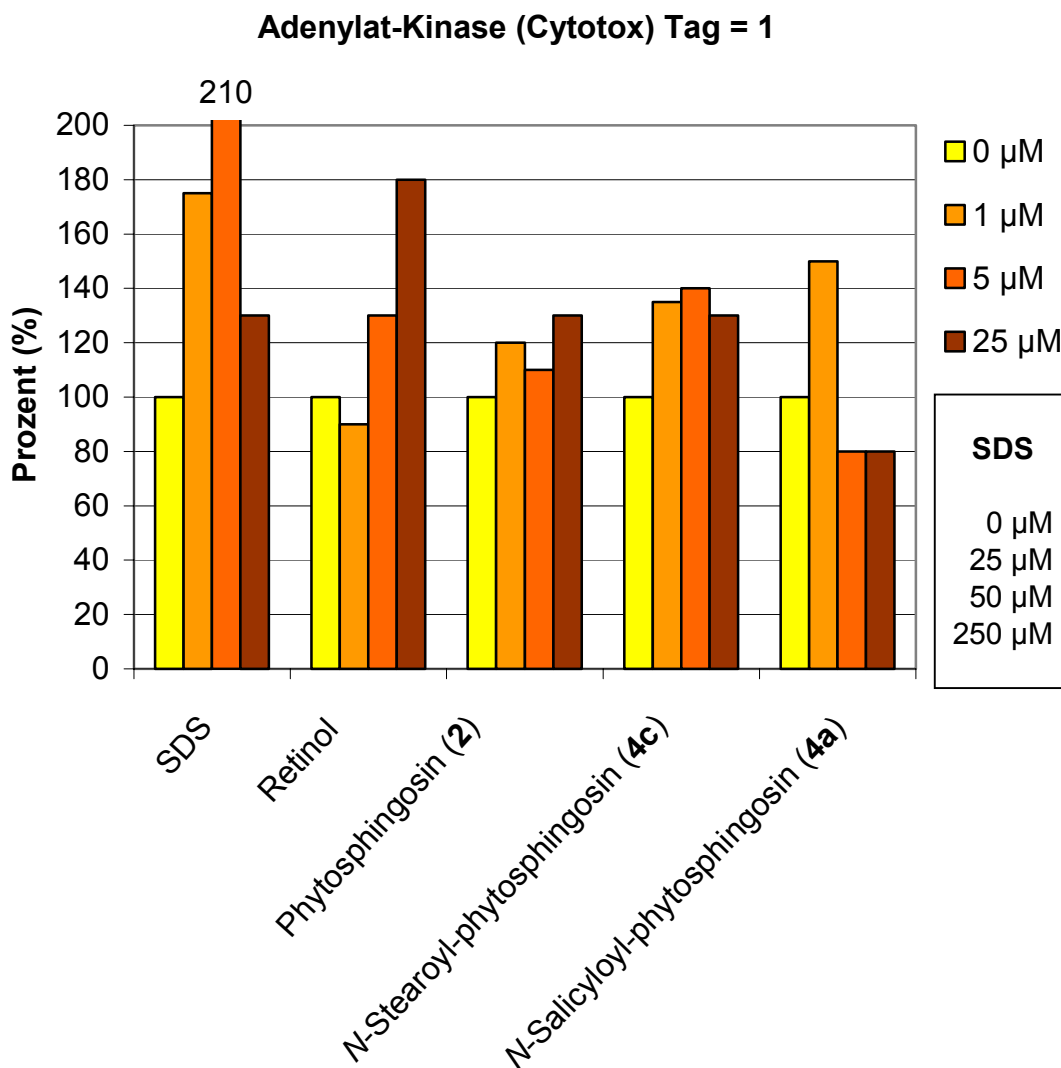
### 4.3.3 ToxiLight™

Zerstörte Zellen setzen das Enzym Adenylatkinase frei und geben es in das Kulturmedium ab. Die Aktivität des Enzyms wird bei dieser Methode photometrisch gemessen.

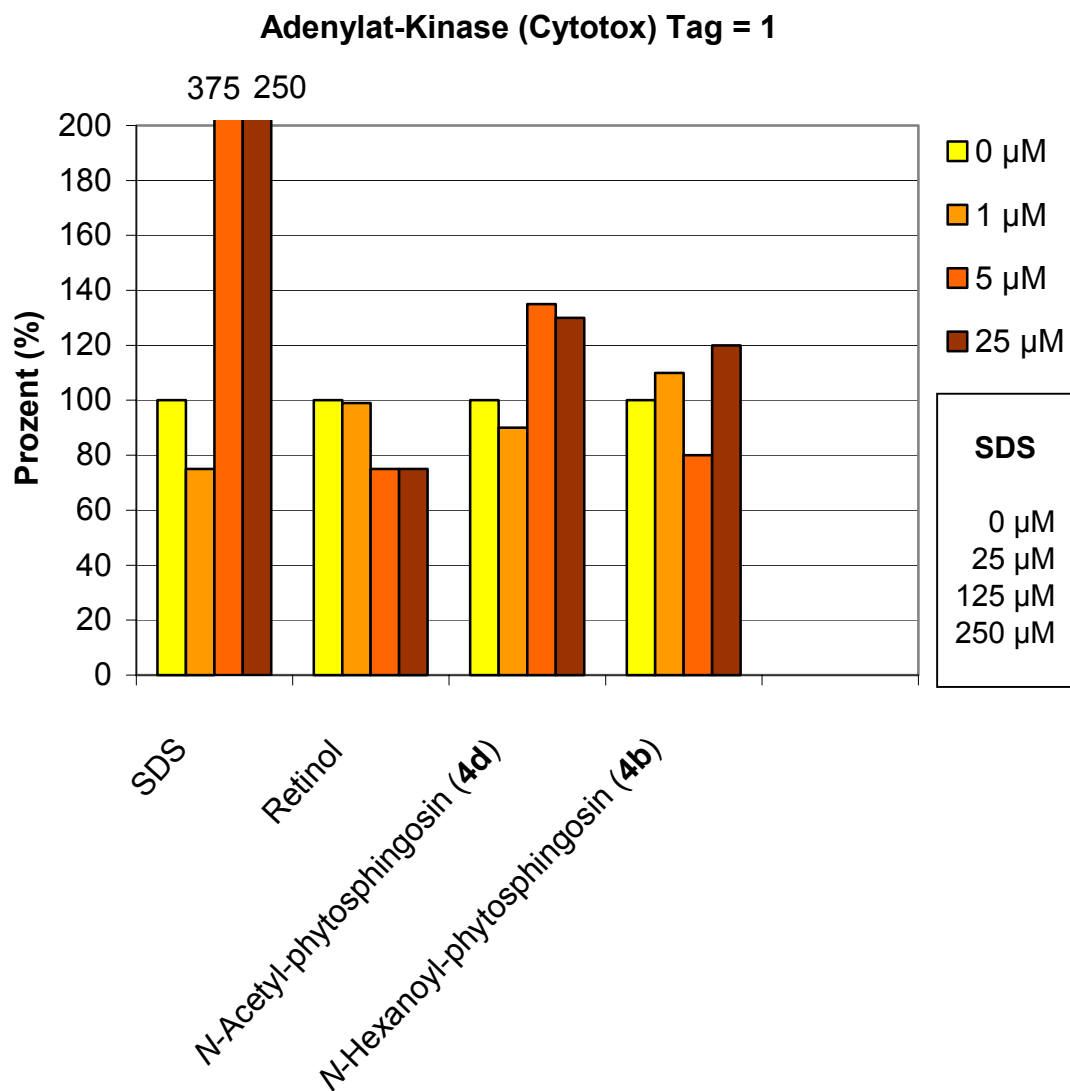
In der Messreihe Typ 1 mit der Zelllinie H 608 zeigt sich lediglich am ersten Tag bei den Kontrollen SDS (50  $\mu$ M) und Retinol (25  $\mu$ M) eine Erhöhung der Adenylatkinase (Abbildung 28). Am vierten Tag zeigt sich, dass eine zunehmende Dauer der Einwirkung zu einer deutlichen Abnahme der gemessenen Adenylatkinase bei der Kontrolle SDS führt. Insbesondere bei den höheren Konzentrationen von 50 und 250  $\mu$ M ist dies zu beobachten. Es wird davon ausgegangen, dass das Enzym über die lange Einwirkungsdauer der hohen Konzentration inaktiv wird. Keine signifikante Differenz der Konzentrationen des Enzyms Adenylatkinase sind bei den Testsubstanzen Phytosphingosin (**2**), *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) und *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) (Abbildung 28 und Abbildung 30) zu beobachten. Die gemessenen Konzentrationen des Enzyms liegen im Bereich der Kontrollen.

In der Messreihe Typ 2 zeigen sich deutliche Abweichungen der Aktivität des Enzyms von den Kontrollen. Am ersten Tag ist in dieser Messreihe lediglich in der Konzentration von 125  $\mu$ M und 250  $\mu$ M für die Kontrolle SDS eine Abweichung (Zunahme) gegenüber den Kontrollen festzustellen (Abbildung 29). Besonders auffällig sind die Zunahmen der Adenylatkinase-Konzentrationen am vierten Tag, bei den Verbindungen *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) in der Konzentration von 25  $\mu$ M, Retinol in der Konzentration von 5  $\mu$ M und SDS in der Konzentration von 25  $\mu$ M. Es zeigt sich auch hier, dass mit zunehmender Dauer der Einwirkung eine deutliche Abnahme der gemessenen Adenylatkinase bei der Kontrolle SDS beobachtet wird (Abbildung 31).

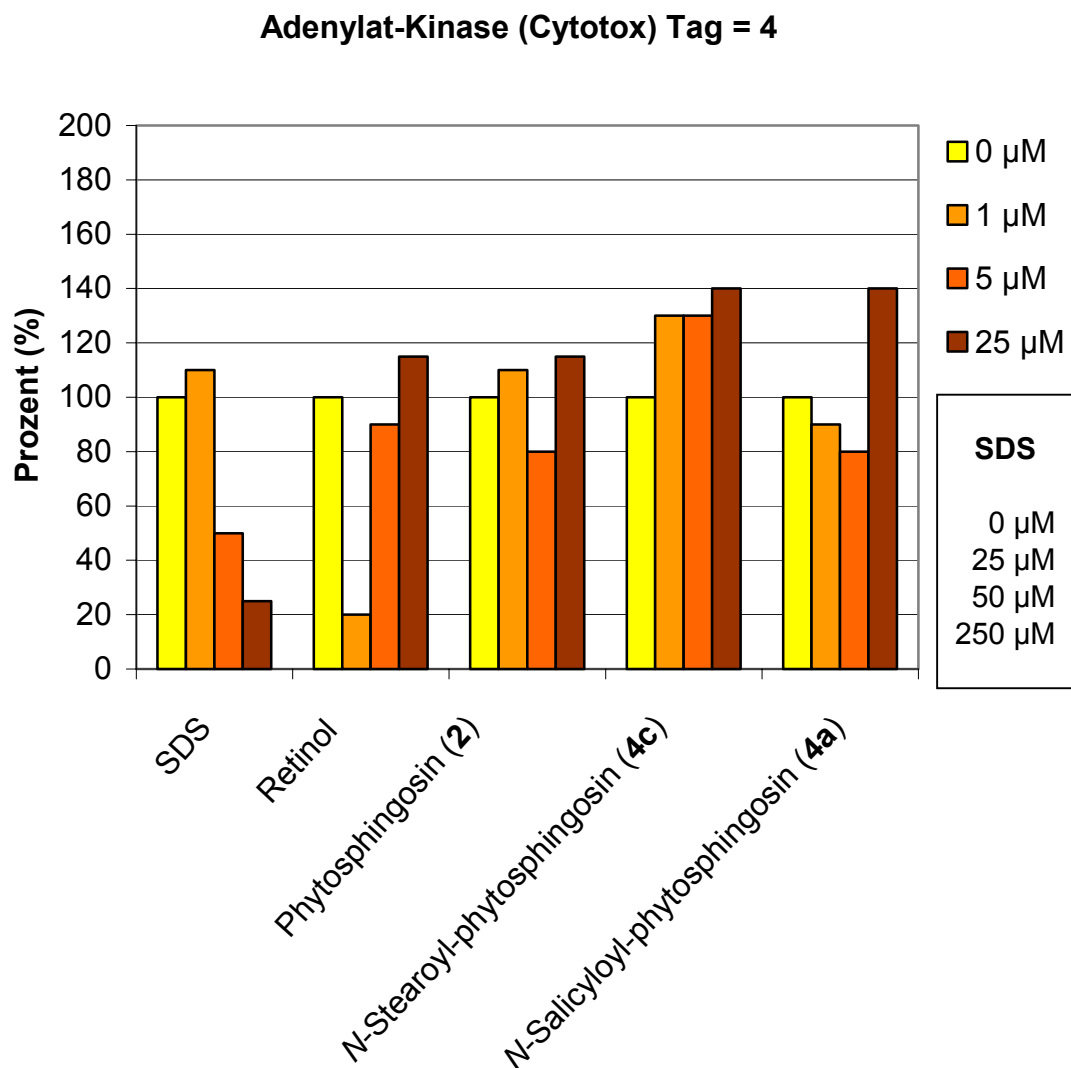




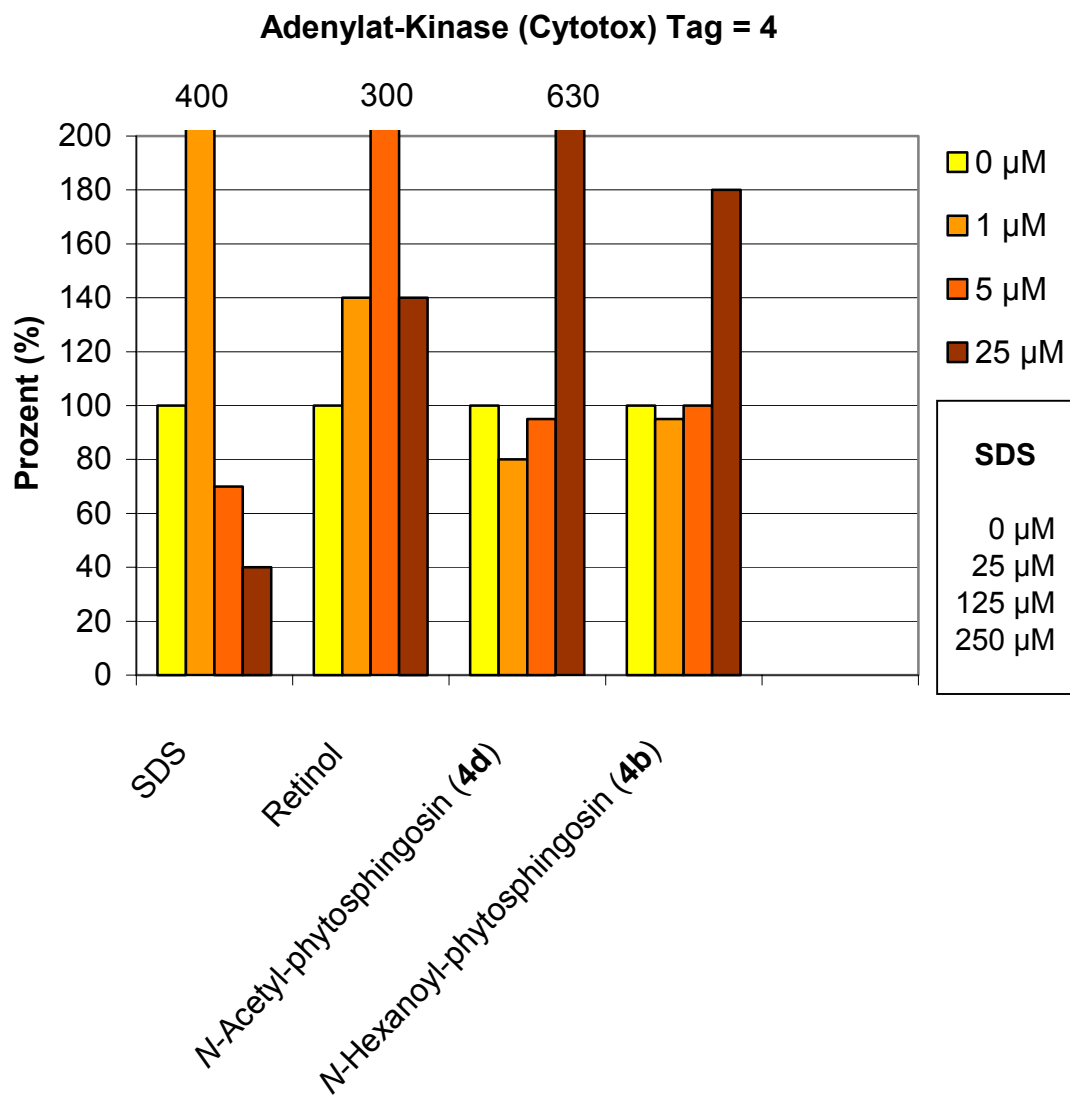
**Abbildung 28:** Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Freisetzung der Adenylatkinase in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am ersten Tag



**Abbildung 29:** Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Freisetzung der Adenylatkinase in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am ersten Tag



**Abbildung 30:** Keratinozyt Typ 1 Zelllinie H 608: Freisetzung der Adenylatkinase in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am vierten Tag



**Abbildung 31:** Keratinozyt Typ 2 Zelllinie H 608: Freisetzung der Adenylatkinase in das Kulturmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration am vierten Tag

### 4.3.4 Zusammenfassung der Zytotoxizitätsuntersuchungen

Aufgrund des Testaufbaus ergibt es sich, dass für SDS und Retinol eine Doppelbestimmung (Keratinozyt Typ 1 und Typ 2) in der gleichen Zelllinie durchgeführt wird. Es zeigt sich, dass die Zytotoxizitätstestmethoden LDH-Freisetzung und ATP-Bestimmung in der Aussage übereinstimmende Ergebnisse liefern. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht mit der Adenylatkinase Freisetzung für die untersuchten Substanzen vergleichbar. Für die Werte der Kontrollsubstanz Retinol sowie für die Verbindung *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) werden mit diesem Test in beiden Ansätzen (Keratinozyt Typ 1 und Typ 2) von den anderen Tests abweichende Aussagen gefunden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Methode Adenylatkinase-Bestimmung für diese Art von Zytotoxizitätsuntersuchung keine zuverlässigen Werte liefert.

Bei der LDH-Freisetzung und der ATP-Bestimmung zeigen die Daten eine gute Übereinstimmung. Bei der Testsubstanz SDS wird bei der LDH-Freisetzung und der ATP-Bestimmung - wie erwartet - eine deutliche Schädigung der Zellen beobachtet. Bei den verwendeten Testsubstanzen (Sphingolipidderivate) und bei der zweiten Kontrolle (Retinol) zeigen sich nach einem Tag Applikationszeit keine signifikanten zytotoxischen Veränderungen. Am vierten Tag sind jedoch Veränderungen bei den Verbindungen *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M zu beobachten.

Bei den angewandten zytotoxischen Bestimmungsmethoden zeigt die Verbindung *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) bei hohen Konzentrationen (25  $\mu$ M) am vierten Tag zellschädigende Eigenschaften. Es ist in der Literatur beschrieben, dass *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) eine spezifische biologische Aktivität besitzt, die ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M und einer Behandlungsdauer von 24 Stunden eine reduzierte Proliferationsrate bewirkt. Ab einer Konzentration von 60  $\mu$ M und einer Behandlungsdauer von 20 Stunden werden deutliche zytotoxische Effekte gemessen [Stoss, 1999].

Das Derivat *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) zeigt ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M sowohl in der LDH-Freisetzung (Abbildung 20, Abbildung 22) als auch bei den ATP-Werten (Abbildung 24, Abbildung 26) deutliche Abweichungen zur Kontrolle sowie zu den anderen Verbindungen in der jeweiligen Testserie. Dass bei der Bestimmung des Enzyms Adenylatkinase am vierten Tag (Abbildung 30) keine signifikante Veränderung messbar war, kann bislang nicht zufrieden stellend erklärt werden.

Auf Grundlage dieser Zytotoxizitätsdaten werden die einzusetzenden Konzentrationen für die weiterführenden DNA-Chip-Analysen festgelegt. Da das *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) und das *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) ab einer Konzentration von 25 µM zytotoxische Eigenschaften zeigen, wird die Konzentration dieser Verbindungen für die Applikationsdauer von vier Tagen auf 5 µM herabgesetzt. Alle anderen Verbindungen werden in einer Konzentration von 25 µM eingesetzt. In der nachstehenden Tabelle 12 sind die Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanzen aufgelistet.

**Tabelle 12:** Einsatzkonzentrationen der Test- und Vergleichsubstanzen für die Applikationsdauer von einem und vier Tagen auf Keratinozyten für die anschließende DNA-Chipanalyse

Testsubstanz	Konzentration Applikationsdauer 1 Tag	Konzentration Applikationsdauer 4 Tage
Kontrolle (A)	-	-
Kontrolle (B)	-	-
Retinol	25 µM	25 µM
Phytosphingosin ( <b>2</b> )	25 µM	25 µM
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin ( <b>4d</b> )	25 µM	5 µM
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )	25 µM	25 µM
<i>N</i> - Stearoyl-phytosphingosin ( <b>4c</b> )	25 µM	25 µM
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> )	25 µM	5 µM

Die Festlegung der Einsatzkonzentrationen der Test- und Vergleichssubstanzen für die DNA-Chipuntersuchungen basieren auf der Verwendung einer Zelllinie (H 608). Damit eine breitere Statistik vorliegt, werden für die nachfolgenden Untersuchungen (Kapitel 4.4, 4.5 und 4.6) drei weitere Zelllinien (H 604, H 614 und H 625) verwendet.

Bei Zelllinien handelt es sich um lebendes Material, daher wird durch einfache optische Kontrolle die Vitalität bzw. Veränderung (Morphologie) der Zellen unter Einwirkung der Substanzen gegenüber unbehandelten Zellen überprüft. Diese Überprüfung lässt frühzeitig Rückschlüsse auf mögliche Einflüsse auf die Zellvitalität zu.

## 4.4 Mikroskopische Ergebnisse

Wenn eine Suspension von dissoziierten epidermalen Keratinozyten ausgesät wird, haften diese Zellen entweder einzeln oder in Klumpen innerhalb der ersten Stunden am Boden des Kultivierungsgefäßes. Zeit und Effektivität der Anheftung sind abhängig vom Untergrund bzw. der Beschichtung des Kultivierungsgefäßes, sowie der Ionenkonzentration im Medium und dem Differenzierungsstadium der ausgesäten Zellen. In einer Zeitspanne von 24 bis 48 Stunden nach dem Aussäen strecken sich die Zellen und beginnen mit ihrer Proliferation. Zunächst wachsen sie kontinuierlich bis sie einen Monolayer bilden. Danach erreichen die Keratinozyten die Konfluenz und beginnen mit der Koloniebildung [Holbrock und Hennings, 1983].

Die drei eingesetzten Zelllinien werden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend mit den Testsubstanzen versetzt. Die optischen Veränderungen der behandelten Keratinozyten werden lichtmikroskopisch nach ein und vier Tagen untersucht sowie photographiert. Ihre morphologischen Unterschiede z.B. Zellgröße, Seneszenz sowie Proliferation werden optisch beurteilt. Beispiele zur Morphologie von Zellen sind in der Abbildung 32 aufgezeigt.



**Abbildung 32:** Keratinozytenmorphologie A: Proliferierende Keratinozyten in einem frühen Stadium [Miyata et al., 2004]; B: Migrierende Keratinozyten [Tasanen et al., 2004]; C: Seneszente Keratinozyten in einem späten Stadium [Miyata et al., 2004]

#### 4.4.1 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen der Keratinozyten

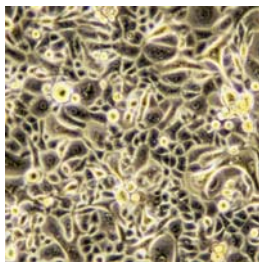
##### Vergrößerung der mikroskopischen Aufnahmen

Objektiv	20x
Phototubus	10x
Tubusfaktor	1x
Kleinbildkamera	0,32x

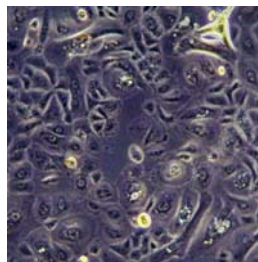
Somit ergibt sich eine 64 fache Vergrößerung. Ein Dia von (24 x 36 mm) lichtet somit eine Fläche von 375 µm x 562 µm ab.

##### Unbehandelte Zellen

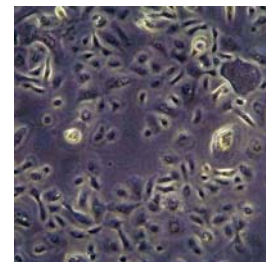
Die unbehandelten Zellen (Abbildung 33) zeigen untereinander wenige Unterschiede in Ihrer Morphologie. Bei den Zelllinien H 614 und H 625 wird im Vergleich zur Zelllinie H 604 die Anzahl der Zellen geringer.



H 604



H 614



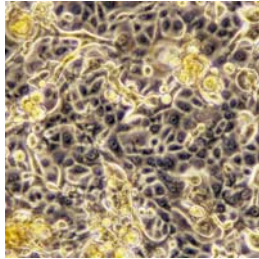
H 625

**Abbildung 33:** Mikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Keratinozytentypen am Tag null

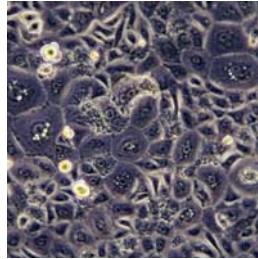
Bei der Zelllinie H 604 sind Unterschiede in der Morphologie im Vergleich zu den beiden Kontrollen (Definition siehe Kapitel 3.5) zu beobachten. Nach einem Tag sind die Zellen nach Behandlung mit der Kontrolle 2 breiter und größer als im Vergleich zur Kontrolle 1 (Abbildung 34 und Abbildung 35). Am vierten Tag zeigt sich eine Vergrößerung der Zellen bei der Kontrolle 1 (Abbildung 36), bei der Kontrolle 2 (Abbildung 37) ist jedoch keine nennenswerte Veränderung der Zellen gegenüber dem ersten Tag zu beobachten. Es zeigt sich, dass die Morphologie der Zelllinie H 604 nach Behandlung mit den Kontrollen zwischen Tag eins und Tag vier nicht direkt vergleichbar ist. Es bleibt hierbei zu berücksichtigen, dass es sich um biologisches Material handelt, welches durchaus natürlichen Schwankungen unterworfen ist.



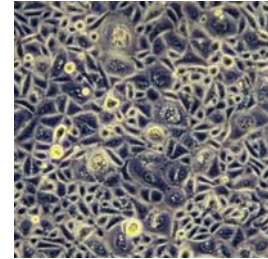
Die Zelllinien H 614 und H 625 zeigen bei der optischen Beurteilung am ersten (Abbildung 34 und 35), sowie am vierten Tag (Abbildung 36 und 37) nach Zusatz von Kontrolle 1 und Kontrolle 2 keine nennenswerten Veränderungen



H 604

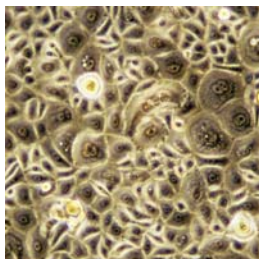


H 614

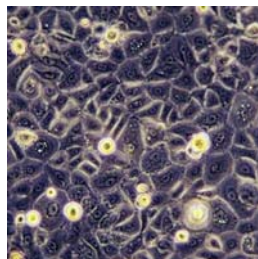


H 625

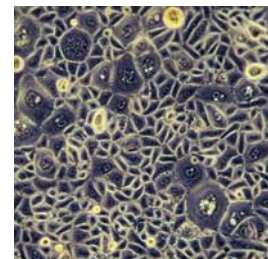
**Abbildung 34:** Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 1 am ersten Tag



H 604

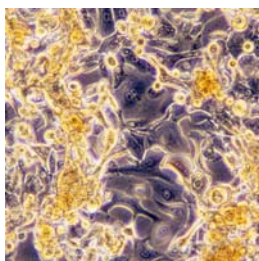


H 614

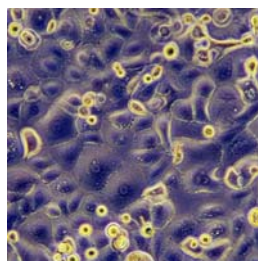


H 625

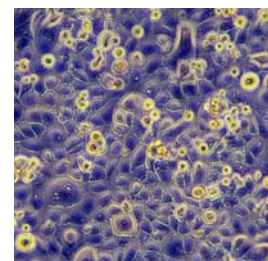
**Abbildung 35:** Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 2 am ersten Tag



H 604

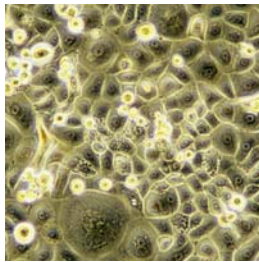


H 614

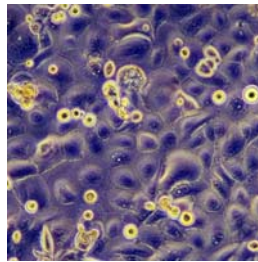


H 625

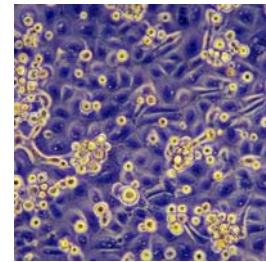
**Abbildung 36:** Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 1 am vierten Tag



H 604



H 614

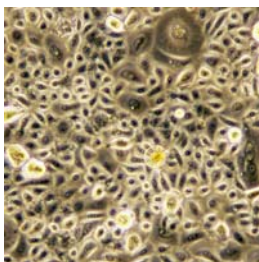


H 625

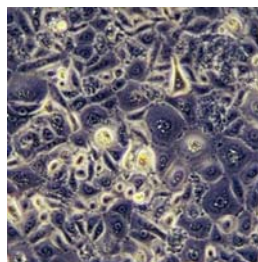
**Abbildung 37:** Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 2 am vierten Tag

### Retinol

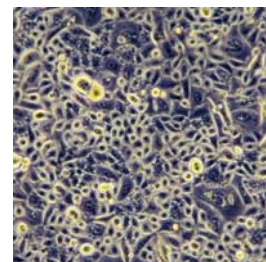
Bei allen drei Zelllinien ist nach Behandlung mit Retinol (25  $\mu$ M) eine Proliferation zu beobachten (Abbildung 38). Nach vier Tagen können bei den Zelllinien H 625 und H 614 migrierende Keratinozyten beobachtet werden (Abbildung 39). Die Form der Zellen wird hierbei kleiner und runder. Die Zellen verlieren den Kontakt zum Boden sowie zu den Nachbarzellen, dies deutet auf ein Absterben der Zellen hin.



H 604

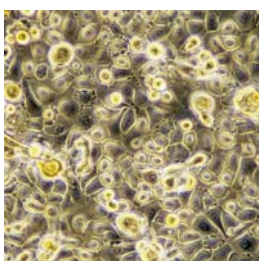


H 614

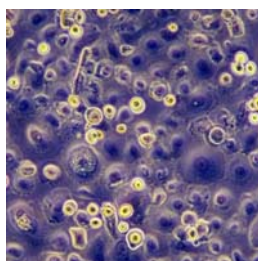


H 625

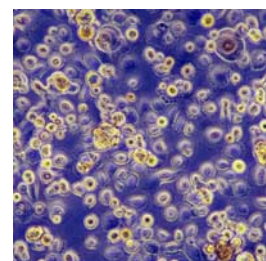
**Abbildung 38:** Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit Retinol (25  $\mu$ M) am ersten Tag



H 604



H 614

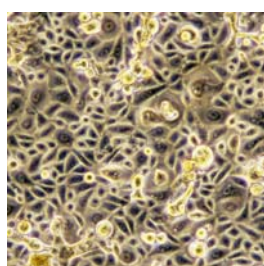


H 625

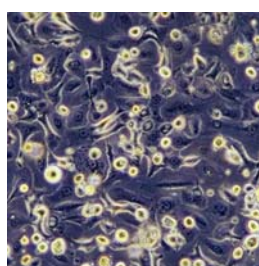
**Abbildung 39:** Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit Retinol (25  $\mu$ M) am vierten Tag

***N*-Acetyl-phytosphingosin (4d)**

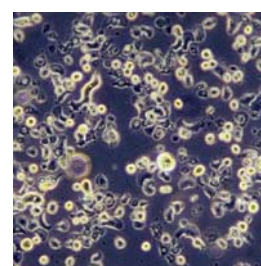
Die Zelllinien zeigen bei der Verbindung *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) nach einem Tag und einer Konzentration von 25  $\mu$ M eine Veränderung ihrer Morphologie. Es zeigen sich migrierende Zellen bei allen drei Zelllinien, wobei diese runder und kleiner werden sowie die Anzahl der Zellen abnimmt (Abbildung 40). Die viertägige Untersuchung der Zellen, bei der die Konzentration der Verbindung 5  $\mu$ M beträgt, zeigen keine nennenswerte Veränderung in ihrer Morphologie. Die Ergebnisse sind im Anhang (Kapitel 9.2) aufgeführt.



H 604



H 614



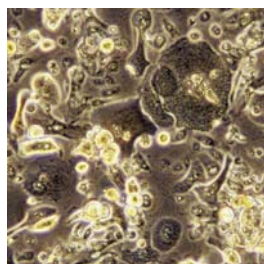
H 625

**Abbildung 40:** Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) (25  $\mu$ M) am ersten Tag

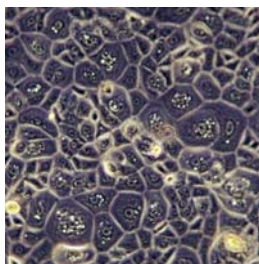
***N*-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)**

Optische Veränderungen sind nach eintägiger Behandlung mit einer Konzentration von 25  $\mu$ M an *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) zu erkennen (Abbildung 41). Die Zellen werden breiter, hauptsächlich ist dies bei den Zellen der Zelllinie H 604 zu beobachten. Sie neigen zur Migration, wobei eine Abflachung und Vergrößerung der Zellen beobachtet werden kann. Bei der viertägigen Behandlung mit *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) zeigen die Zellen keine nennenswerten Veränderungen in ihrer Morphologie, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, dass die Konzentration hier auf 5  $\mu$ M herabgesetzt wird. Die Ergebnisse sind im Anhang (Kapitel 9.2) aufgeführt.

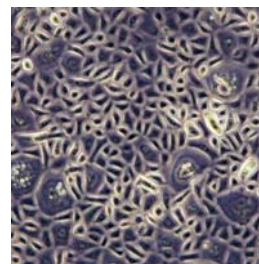




H 604



H 614



H 625

**Abbildung 41:** Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten nach Behandlung mit *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) (25  $\mu$ M) am ersten Tag

Keine nennenswerten optischen Veränderungen in der Morphologie werden am ersten Tag bei den Verbindungen Phytosphingosin (**2**), *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) sowie *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) beobachtet. Am vierten Tag ist auch hier ein Einsetzen des Absterbens der Zellen zu beobachten, da die Zellen den Kontakt zum Boden und den Nachbarzellen verlieren. Die Ergebnisse sind im Anhang (Kapitel 9.2) aufgelistet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei den behandelten Zelllinien deutliche Unterschiede nach Ende der Applikationsdauer mit den Testsubstanzen beobachtet werden konnten. Am ersten Tag wird im Vergleich zu den Kontrollen eine Abnahme der Zellanzahl sowie ein Absterben der Zellen nach Behandlung mit *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) (25  $\mu$ M) beobachtet. Nach vier Tagen kann im Vergleich zu den Kontrollen kein Unterschied zu den behandelten Zellen beobachtet werden, hierbei muss jedoch die verringerte Einsatzkonzentration beim *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) und *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) auf eine Konzentration von 5  $\mu$ M berücksichtigt werden.

Anhand der vorhergegangenen Zytotoxizitätsbestimmungen (Kapitel 4.3), bei der für alle Testsubstanzen die gleiche Zelllinie H 608 verwendet wurden, konnte eine Veränderung der Zellen anhand der Kontrollen 1 und 2 festgestellt werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Kontrollen (Kontrolle 1 und 2) um die gleichen Proben handelt, wobei die Zeitpunkte der Durchführung sich unterscheiden. Die Untersuchungen werden bei der Kontrolle 1 direkt nach der Konfluenz der Keratinozyten durchgeführt. Zeitlich begründet wird die Kontrolle 2 erst 48 Stunden später auf Keratinozyten appliziert.

Eine Veränderung der Zellen wird auch bei den drei unterschiedlichen Zelltypen H 604, H 615 und H 625 beobachtet. Es konnten für die beiden identischen Kontrollen 1 und 2 Unterschiede in der Zellmorphologie der Zelllinie H 604 (Zellen bei der Kontrolle 2 breiter und größer) beobachtet werden.

Es ist in der Literatur beschrieben, dass Zellen unterschiedlicher Herkunft (Geschlecht, Alter, Herkunft etc.) unterschiedliche Empfindlichkeiten haben [Ponec et al., 2000]. Daraus ist abzuleiten, dass die drei Zelllinien unterschiedlich auf die Testsubstanzen reagieren. Eine gute Übereinstimmung in der Morphologie findet sich in den Zelllinien H 615 und H 625, lediglich die morphologischen Unterschiede in der Zelllinie (H 604) nach der Behandlung mit identischen Testsubstanzen (Kontrolle 1 und 2) sind unerwartet und bislang nicht erklärt.

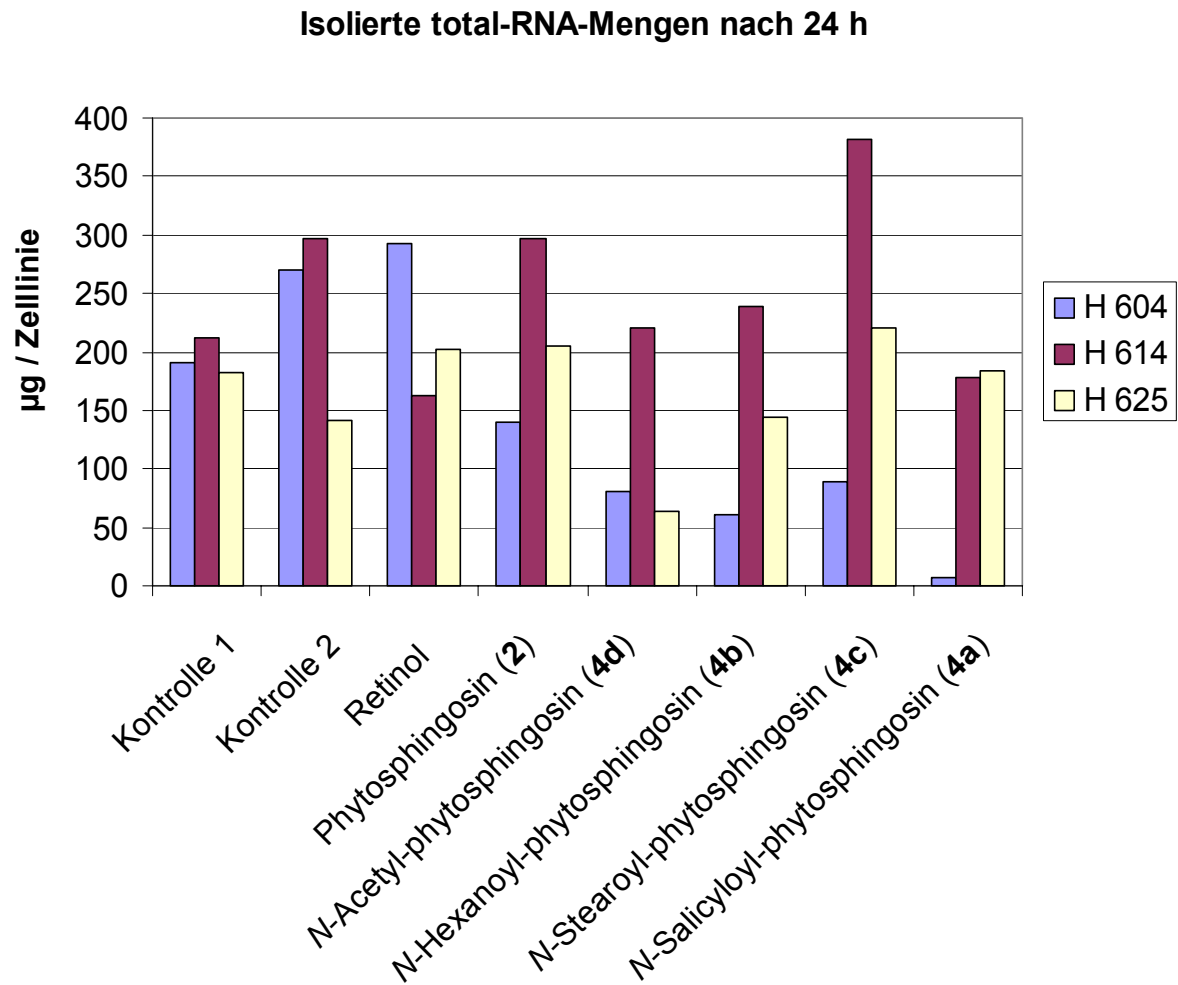
Beim Retinol ist nach einem Tag eine Vermehrung bei allen Zelllinien zu beobachten. Dies war zu erwarten, denn es ist bekannt, dass Retinol und seine Metaboliten für eine Vielzahl physiologischer Funktionen, u.a. auch die Proliferation der Zellen, von Bedeutung sind [Eskild und Hanson, 1994].

Größere und abgeflachte Zellen (Differenzierung) konnten beim *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) beobachtet werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Zelllinie H 604 empfindlicher zu sein scheint, da sich die Zellen dieser Zelllinie bei allen Testsubstanzen, insbesondere nach vier Tagen, vergrößern und teilweise den Kontakt zu den Nachbarzellen verlieren. Somit zeigt sich, dass Untersuchungen auf Grundlage menschlichen Materials (Keratinozyten) von der Konstitution des Spenders abhängig sind. Um eine Vergleichbarkeit der menschlichen Keratinozyten zu erlangen ist es folglich notwendig, verschiedene Keratinozytentypen unterschiedlicher Spender einzusetzen und diese unabhängig voneinander zu beobachten.

## **4.5 Isolation der RNA aus den Keratinozyten**

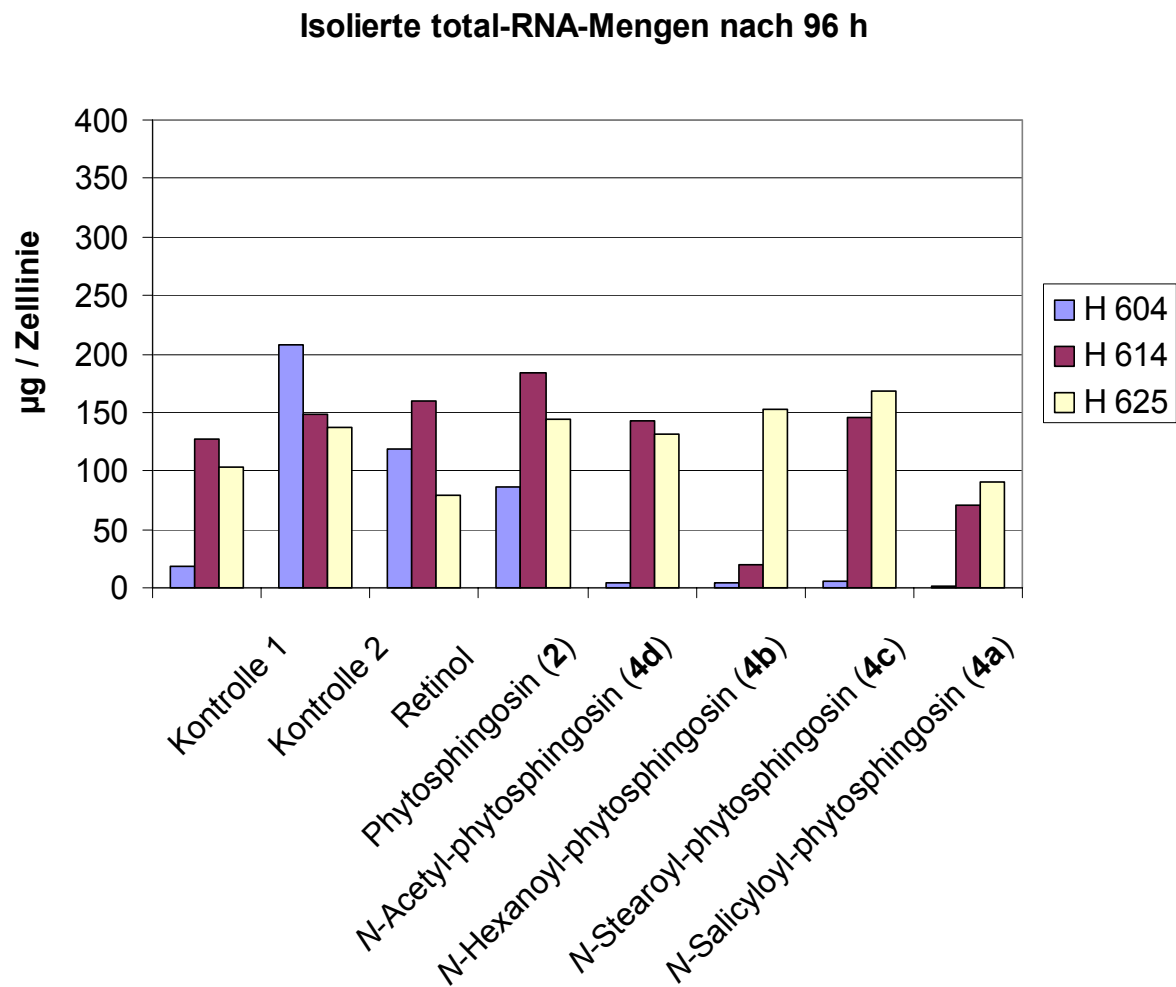
Nach Ablauf der Verweilzeit der Testsubstanzen auf den Keratinozyten wird die total-RNA aus den Keratinozyten herausgelöst und photometrisch bestimmt (Tabelle 13 und 14). Die isolierten RNA-Mengen sind ein Indikator für den Viabilitäts- und Differenzierungszustand der Zellen, wobei die Transkriptionsaktivität als ein Maß für die Lebendigkeit der Zellen angesehen werden kann. Die Durchführung erfolgt am Uniklinikum Regensburg durch die Abteilung Klinische Chemie.



**Abbildung 42:** Isolierte RNA-Mengen aus den Keratinozyten der Zelllinie H 604, H 614 und H 625 nach einer Applikationszeit der Test- und Kontrollsubstanzen von 24 Stunden (Tabelle 13)

**Tabelle 13:** Isolierte RNA-Mengen [ $\mu\text{g}$ ] aus den Keratinozyten der Zelllinien H 604, H 614 und H 625 nach einer Applikationszeit von 24 Stunden

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	H 604 [ $\mu\text{g}$ ]	H 614 [ $\mu\text{g}$ ]	H 625 [ $\mu\text{g}$ ]
Kontrolle 1	-	192	212	182
Kontrolle 2	-	270	297	142
Retinol	25	292	163	203
Phytosphingosin ( <b>2</b> )	25	140	297	205
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin ( <b>4d</b> )	25	81	221	63
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )	25	61	239	144
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin ( <b>4c</b> )	25	90	382	220
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> )	25	7	178	183



**Abbildung 43:** Isolierte RNA-Mengen aus den Keratinozyten der Zelllinie H 604, H 614 und H 625 nach einer Applikationszeit der Test- und Kontrollsubstanzen von 96 Stunden (Tabelle 14)



**Tabelle 14:** Isolierte RNA-Mengen [ $\mu\text{g}$ ] aus den Keratinozyten der Zelllinien H 604, H 614 und H 625 nach einer Applikationszeit von 96 Stunden

Substanz	Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	H 604	H 614	H 625
Kontrolle 1	-	18	127	103
Kontrolle 2	-	208	148	137
Retinol	25	118	160	80
Phytosphingosin ( <b>2</b> )	25	87	183	145
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin ( <b>4d</b> )	5	5	142	131
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )	25	4	20	152
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin ( <b>4c</b> )	25	6	145	169
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin ( <b>4a</b> )	5	2	71	91

Von jeder Zelllinie werden drei Ansätze (Keratinozyten) isoliert und diese nach der Konfluenz mit den Testsubstanzen versetzt. Anschließend werden die drei Ansätze vereinigt und die total-RNA-Mengen bestimmt. Nach vier Tagen ist eine deutliche Abnahme der isolierten total-RNA-Mengen aus den Keratinozyten für alle drei Zelllinien zu beobachten (Abbildung 42 und 43). Nach einem Tag wird durchschnittlich eine total-RNA Menge von ca. 200  $\mu\text{g}$  isoliert, hingegen beträgt nach vier Tagen die Quantität der isolierten total-RNA Menge nur noch ca. 100  $\mu\text{g}$  (Tabelle 13 und 14).

Auffällig für Zelllinie H 604 ist, dass die total-RNA-Menge nach 24 Stunden für die Kontrolle 1 und 2, Retinol und Phytosphingosin (**2**) in der gleichen Größenordnung liegen. Hingegen zeigt sich für die weiteren Derivate eine deutliche Verringerung der total-RNA-Menge. Dieser Trend findet sich bei den Ergebnissen nach 24-Stunden, aber ausgeprägter bei den Ergebnissen nach 96-Stunden, wo nur geringe Mengen an total-RNA messbar sind. Desweiteren ist auffällig, dass bei den 96-Stunden-Werten die total-RNA-Mengen der Kontrollen nicht miteinander vergleichbar sind. Die total-RNA-Menge bei der Kontrolle 1 in der Zelllinie H 604 liegt um den Faktor 10 unter der Menge von Kontrolle 2. Bei den mikroskopischen Aufnahmen konnte ebenfalls bei der Zelllinie H 604 bei beiden Kontrollen 1 und 2 eine optische Veränderung im Vergleich zueinander festgestellt werden.

Bei den weiteren Zelllinien H 614 und H 625 werden diese Ergebnisse nicht bestätigt. Die Mengen an total-RNA liegen sehr nahe an den Ergebnissen der Kontrolle (Tabelle 13 und 14). Einzuschränken ist diese Beobachtung für zwei Substanzen: *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) und *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**). Das *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) zeigt nach 24 Stunden in der Zelllinie H 625 nur eine geringe Menge an total-RNA, hingegen in den 96 Stunden-Werten liegen diese im Bereich der Kontrollwerte. Bei der Interpretation dieser Beobachtung ist aber die Verringerung der Wirkstoffkonzentration von 25 µM auf 5 µM zu berücksichtigen. Die Konzentrationsverringerung auf 5 µM war eine Konsequenz der zytotoxischen Untersuchungen (Kapitel 4.3, Tabelle 12). Die total-RNA-Mengen sind mit den Beobachtungen der mikroskopischen Untersuchungen vergleichbar (Kapitel 4.4).

Die total-RNA-Menge in der Zelllinie H 614 ist nach 24 Stunden bei dem *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) nahezu doppelt so groß, wie für die Kontrolle. Dieses deutliche Ergebnis kann bei den 96-Stunden-Werten nicht wiedergefunden werden. Bei diesen Werten liegt die total-RNA-Menge im Durchschnitt der Kontrolle.

Dies bedeutet, dass bei der Durchführung derartiger Versuchsreihen das biologische Material einen entscheidenden Einfluss hat. Der direkte Vergleich der total-RNA-Mengen der drei Zelllinien zeigt, dass absolut betrachtete Quantitätsunterschiede einen Faktor von 4-6 ergeben. Daraus lässt sich schließen, dass für reproduzierbare Ergebnisse, die Untersuchung soweit wie möglich unabhängig von der Qualität der Zelllinien sein sollte. Daher empfiehlt es sich zukünftig unterschiedliche Herkunftspuren zu verwenden, um individuelle Herkunftseinflüsse der jeweiligen Zelllinien zu mitteln.

Wie zu erwarten war, ergibt sich für nahezu alle Substanzen nach einer Applikationszeit von 96 Stunden eine geringere Menge an total-RNA. Eine Differenzierung der einzelnen Substanzen auf Grundlage der total-RNA-Mengen ist nicht möglich.

Für die nachfolgende Methode (DNA-Chip) wird aus jeder der drei Zelllinien die gleiche definierte Menge an total-RNA entnommen und für die Untersuchung verwendet.

## 4.6 DNA-Chip-Ergebnisse

Die untersuchten Marker werden aus dem Bereich der Hautdifferenzierung sowie dem allgemeinen Aufbau der Haut ausgewählt (Kapitel 2.5.1). In den nachstehenden Tabellen werden die induzierten und reprimierten Marker für die jeweiligen Testsubstanzen der DNA-Chipanalyse dargestellt. Die Expressionen der Substanzen werden im Bezug auf die Kontrollen ausgewertet. Die Auswertung erfolgt computerunterstützt mit der Software von Affymetrix Gene Chip unter Verwendung des MAS 5-Algorithmus. Im Rahmen der Auswertung werden Werte basierend auf Ergebnissen des Algorithmus der jeweiligen Kontrollen korreliert. Ergebnisse, die vom Algorithmus auf beiden Arrays als nicht detektierbar oder im paarweisen Vergleich als unverändert gelesen werden, werden als NC (nicht verändert) gewertet. Signale, die eine Veränderung zeigen, werden entsprechend als I (Induziert ↑) bzw. D (Reprimiert ↓) gewertet.

**Tabelle 15:** Marker nach der Auswertung der DNA-Chip-Analyse nach einer Applikationszeit von einem Tag (24 Stunden)

Marker	Retinol	PS (2)	PS-C2 (4d)	PS-C6 (4b)	PS-C18 (4c)	PS-SLC (4a)
Transglutaminase 1	D	I	I	I	I	I
Loricrin	D	NC	NC	I	NC	D
Filaggrin	D	NC	NC	I	NC	NC
Involucrin	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Keratin 10	NC	NC	NC	NC	NC	D
Keratin 5	D	NC	NC	NC	NC	D
Skalp	D	I	I	I	NC	I
Kollagen VII	D	NC	NC	NC	NC	NC
MMP 1	I	I	I	I	D	I
Aquaporin 3	NC	NC	I	NC	NC	I

**Tabelle 16:** Marker nach der Auswertung der DNA-Chip-Analyse nach einer Applikationszeit von vier Tagen (96 Stunden)

Marker	Retinol	PS (2)	PS-C2 (4d)	PS-C6 (4b)	PS-C18 (4c)	PS-SLC (4a)
Transglutaminase 1	D	I	NC	I	NC	I
Loricrin	D	I	I	NC	NC	I
Filaggrin	D	NC	NC	NC	NC	I
Involucrin	D	I	NC	NC	NC	NC
Keratin 10	D	NC	NC	NC	NC	NC
Keratin 5	NC	I	NC	NC	NC	NC
Skalp	D	I	NC	NC	NC	I
Kollagen VII	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MMP 1	NC	I	NC	I	NC	I
Aquaporin 3	NC	NC	NC	NC	NC	I

Die Ergebnisse sind im Anhang (Kapitel 9.3) aufgeführt.

### Retinol

Nach einem Tag Behandlung mit Retinol zeigt sich eine Induzierung des Markers MMP 1, nach vier Tagen ist keine Expression dieses Markers zu beobachten. Eine Reprimierung konnte am ersten Tag bei Keratin 5 und Kollagen VII und am vierten Tag bei Keratin 10 und Involucrin beobachtet werden. Eine Reprimierung wird am ersten und vierten Tag bei Transglutaminase 1, Filaggrin, Loricrin und Skalp gesehen. Die Differenzierungsmarker zeigen über die Applikationsdauer ein ausgeprägtes Verhalten zur Reprimierung.

### *N*-Acetyl-phytosphingosin (4d)

Nach einer Applikation von *N*-Acetyl-phytosphingosin (4d) zeigt sich am ersten Tag eine Induzierung von Transglutaminase 1, Skalp, Aquaporin und MMP 1. Am vierten Tag konnte nur bei Loricrin eine Induzierung gesehen werden. Eine Reprimierung konnte weder am ersten Tag noch am vierten Tag gemessen werden. Über den Zeitraum der Applikation nimmt die Induzierungstendenz der einzelnen Marker ab.

### *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (4b)

Eine Applikationszeit von einem Tag zeigt bei den Markern Transglutaminase 1, Skalp, Filaggrin, MMP 1 und Involucrin eine Induzierung. Am vierten Tag wird dies nur bei Transglutaminase und MMP 1 beobachtet. Somit sind diese Marker über den gesamten Applikationszeitraum induziert.

**Phytosphingosin (2)**

Phytosphingosin (2) zeigt nach einer eintägigen Behandlung eine Induzierung bei der Transglutaminase 1, Skalp und MMP 1, am vierten Tag wird eine Induzierung bei Transglutaminase 1, Skalp, MMP 1 und Loricrin gesehen. Eine Reprimierung wird weder am ersten Tag noch am vierten Tag beobachtet.

**N-Stearoyl-phytosphingosin (4c)**

Die Applikation mit N-Stearoyl-phytosphingosin (4c) zeigt nur am ersten Tag eine Induzierung von MMP 1 und Transglutaminase 1.

**N-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)**

Am ersten und vierten Tag wird eine Induzierung bei Transglutaminase 1, Skalp, MMP 1 und Aquaporin 3 beobachtet. Zusätzlich wird eine Induzierung am vierten Tag bei Filaggrin und Loricrin gesehen. Eine Reprimierung wird am ersten Tag bei Keratin 5, Keratin 10 und Loricrin beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich zu den Ergebnissen der Expressionsuntersuchungen sagen, dass diese für die einzelnen Testsubstanzen komplex sind. Trends und Tendenzen bei den induzierten und reprimierten Markern verschieben sich über die Applikationsdauer.

Bei der Auswertung der Expressionsuntersuchungen nach einer Applikationszeit von 24 und 96 Stunden ist für das Retinol die Tendenz zur Reprimierung zu erkennen. Ausgeprägt ist dies Verhalten bei den Differenzierungsmarkern Transglutaminase 1, Filaggrin und Loricrin sowie beim Skalp. Bei den 96-Stunden-Ergebnissen zeigen die Differenzierungsmarker Keratin 10 und Involucrin sich zusätzlich zur Transglutaminase 1, Filaggrin und Loricrin reprimiert. Bei den 24-Stunden-Werten ist die Reprimierung des Keratin 5 und Kollagen VII zu beobachten.

Es ist etabliert, dass Retinol einen entscheidenden Einfluss beim Hautaufbau, Reparaturmechanismus und der Differenzierung hat [Didirjean, 1999]. Die negativen Einflüsse, wie z.B. Hautirritation bei höheren Retinolkonzentrationen sowie die Abnahme der Hautschichtdicke, sind ebenfalls in der Literatur bekannt [Farwick, 2005]. Es ist hierbei jedoch zu beachten, dass in der Literatur *in-vivo*- als auch *in-vitro*-Studien beschrieben werden. Die Ergebnisse von *in-vivo*-Experimenten sind nicht deckungsgleich zu den Erkenntnissen aus den *in-vitro*-Studien. Letztere mit Retinol in Keratinozyten zeigen für Keratin 5 und 10, für Transglutaminase 1 und Loricrin eine Reduzierung. Mit *in-vivo*-Studien lässt sich kein Effekt nachweisen [Fischer, 1996]. Dies liegt wahrscheinlich an der komplexen Matrix der Haut aus Keratinozyten, Langhanszellen und Melanozyten [Forslind, 1999].

Im Vergleich zum Retinol zeigen die Expressionsuntersuchungen nach 24 und 96 Stunden für die weiteren eingesetzten Testsubstanzen eine Induzierung der Marker. Besonders ausgeprägt ist das induzierte Verhalten der Differenzierungsmarker nach der Behandlung mit Phytosphingosin (**2**) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**), im Laufe der Testdauer nimmt hier die Anzahl der induzierten Marker zu. Beim *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) wird hingegen die Abnahme der induzierten Marker im Laufe der Testdauer beobachtet. Dies bedeutet ausgeprägte und deutliche Effekte dieser Verbindungen, wobei ein sofortiger Effekt auf die Differenzierungsmarker nach einer Applikationsdauer von 24 Stunden beim *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) und ein verzögerter Effekt nach 96 Stunden für die Verbindungen Phytosphingosin (**2**) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) beobachtet werden.

Im Rahmen der Untersuchung zeigte sich einzig beim *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) eine Veränderung von induziertem zu reprimiertem Verhalten. Bei den 24-Stunden-Resultaten zeigten sich die Differenzierungsmarker Loricrin und Keratin 10 sowie der Proliferationsmarker Keratin 5 reprimiert, jedoch die Transglutaminase 1 induziert. Im Gegensatz dazu ergaben die Ergebnisse nach 96 Stunden für die Differenzierungsmarker Transglutaminase 1, Filaggrin und Loricrin ein induziertes Verhalten.

Eine Induzierung der Kollagenase MMP 1 wird durch die Testsubstanzen am ersten als auch am vierten Tag beobachtet, lediglich das *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) zeigt am ersten Tag eine Reprimierung. Eine Induzierung der Kollagenase MMP 1 ist ein bekanntes Verhalten für die akute oder chronische Wundheilung [Schaffer et al., 1997, Trengove et al., 1999]. Darüberhinaus besteht in der Literatur kein Zweifel, dass einigen MMPs eine Schlüsselrolle bei der Wundheilung zukommt. In der Literatur ist das MMP 1 als positiver Effekt für Wundheilungsprozesse bekannt und als einer der wichtigen Marker für die Keratinozytenmigration beschrieben [Pilcher et al., 1997]. Eindeutige Tendenzen lassen sich bei den weiteren Testsubstanzen nicht beobachten.

## 4.7 Validierung der Hautmodelle

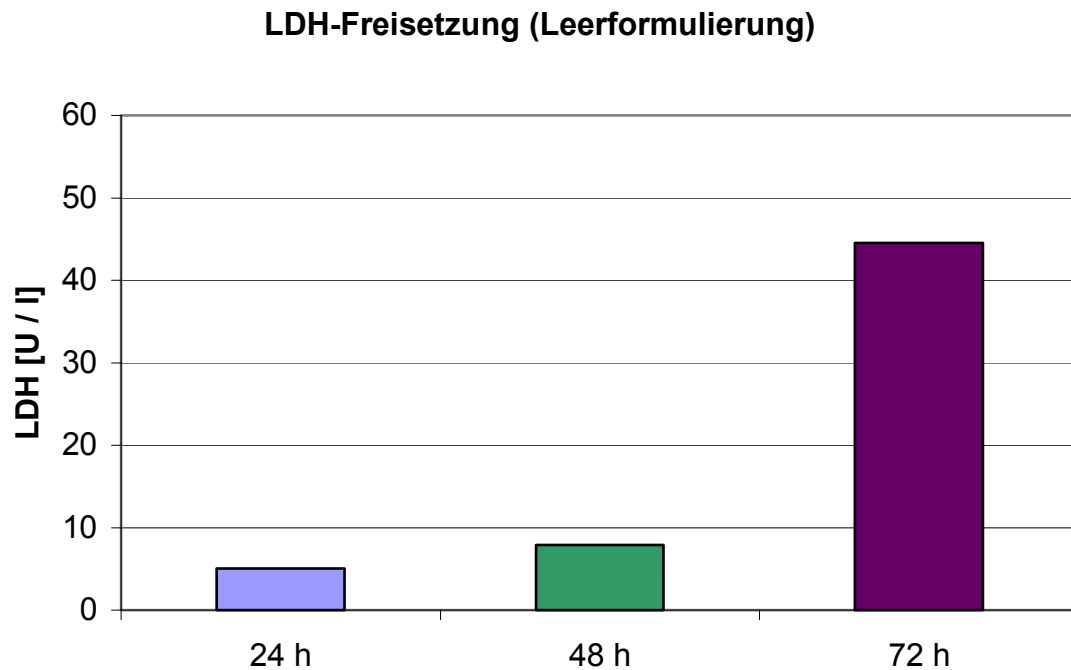
In dem Kulturmedium der Hautmodelle werden innerhalb der Versuchsdauer zytotoxische Bestimmungen durchgeführt. Die Resultate bilden einen der Parameter für die Validierung der Hautmodellversuche. Ein weiterer Parameter ist die Isolierung und Aufarbeitung der total-RNA-Menge und deren Untersuchung mittels RT-PCR im Vergleich zu kommerziell erhältlicher RNA menschlichen Ursprungs. Die so erhaltenen Ergebnisse bilden die Grundlage für den Validierungsansatz. Der Vergleich der Applikationsdauer von Wirkstoffen auf Hautmodellen wird aufgrund von Erfahrungen von Herstellerseite auf 72 Stunden begrenzt. Damit im Rahmen der Methodenentwicklung der optimale Zeitrahmen für die Wirkstoffuntersuchung festgelegt werden kann, werden im Vorfeld Untersuchungen nach 24 und 72 Stunden durchgeführt.

Ein weiterer Ansatz der Validierung beruht auf dem Vergleich der  $\Delta$ CT-Werte der Hautmodelle mit denen aus kommerziell erhältlicher RNA menschlichen Ursprungs.

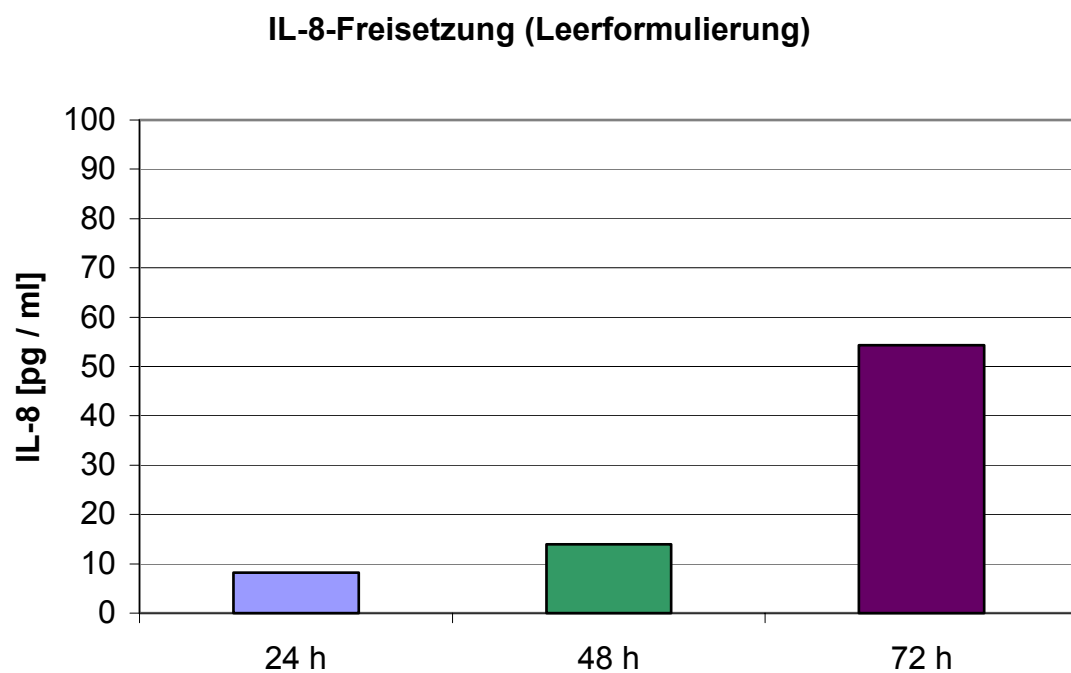
### 4.7.1 Auswertung der zytotoxischen Bestimmung der Hautmodelle (Leerformulierungen)

Die Hautmodelle werden mit den Leerformulierungen (Kapitel 3.8) behandelt und die LDH-Freisetzung und der Interleukin-8-Gehalt im Kulturmedium der Hautmodelle analysiert. Diese Bestimmungen dienen zur Feststellung des allgemeinen Zustands der Hautmodelle.

Im Rahmen des Versuchs werden drei Hautmodelle eingesetzt. Die Gesamtversuchsdauer für diese Modelle beträgt 72 Stunden, wobei aus dem Kulturmedium jedoch nach 24, 48 und 72 Stunden die Zytotoxizität anhand der Bestimmungsmethoden Interleukin-8 und LDH-Freisetzung (Abbildung 44 und 45) bei der Degussa in Krefeld durch die Abteilung LTÖ beobachtet wird. Diese Hautmodelle werden aufgearbeitet und mit der RT-PCR-Methode näher untersucht (Kapitel 4.7.3). Beide Methoden, die LDH-Freisetzung und die Interleukin-8-Bestimmung, zeigen nach 72 Stunden deutlich erhöhte Werte gegenüber den Werten nach 24 bzw. 48 Stunden. Der Anstieg der Werte von 24 zu 48 Stunden ist gering, der Anstieg von 48 zu 72 Stunden ist eine Verdoppelung bzw. Vervierfachung der gefundenen Werte. Dies bedeutet, dass die Hautmodelle nach 72 Stunden eine deutliche unterschiedliche Physiologie zeigen. Die zunehmende LDH-Freisetzung ist ein Zeichen dafür, dass die Zellen beginnen abzusterben. Gleichzeitig setzen die Entzündungsreaktionen ein und das proinflammatorische Zytokin IL-8 wird sezerniert.



**Abbildung 44:** LDH-Freisetzung in das Kulturmedium der Hautmodelle nach einer Applikationsdauer der Leerformulierungen von 24, 48 und 72 Stunden



**Abbildung 45:** Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) in das Kulturmedium der Hautmodelle nach einer Applikationsdauer der Leerformulierungen von 24, 48 und 72 Stunden

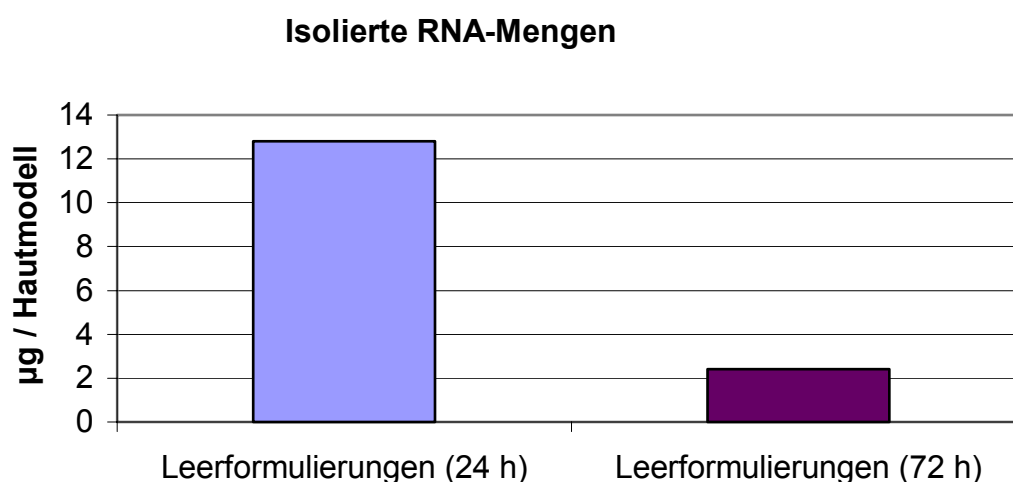


## 4.7.2 Isolierte RNA-Mengen der Hautmodelle (Leerformulierungen)

Aus den mit Leerformulierungen behandelten Hautmodellen (Kapitel 4.7.1) wird nach 24 bzw. 72 Stunden die RNA isoliert und ihre Menge mittels Photometrie bestimmt. Die isolierten RNA-Mengen (Tabelle 17) sind ein Indikator für den Viabilitäts- und Differenzierungszustand der Zellen, wobei die Transkriptionsaktivität als ein Maß für die Lebendigkeit der Zellen gesehen werden kann.

**Tabelle 17:** Isolierte RNA-Mengen aus den mit Leerformulierungen behandelten Hautmodellen, Angaben der total RNA in  $\mu\text{g}/\text{Hautmodell}$  ( $0,5\text{ cm}^2$ )

Probennummer	Mittelwert (n = 3) total RNA [Ø]
Leerformulierungen (24h)	12,8
Leerformulierungen (72h)	2,4



**Abbildung 46:** Isolierte RNA-Mengen [ $\mu\text{g}$ ] der Hautmodelle nach 24- und 72-stündiger Behandlung mit Leerformulierungen

Der 72-Stunden-Wert an total-RNA liegt weit unter dem 24-Stunden-Wert. Daraus lässt sich ableiten, dass die Viabilität der Zellen nach 72 Stunden deutlich geringer ist als nach 24 Stunden. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen der zytotoxischen Untersuchungen (Kapitel 4.7.1). Auf der Basis dieser physiologischen Befunde lässt sich ableiten, dass eine Inkubationsdauer von 72 Stunden zu lang ist, um ein hautrelevantes Testsystem abzubilden.

Eine Inkubation über einen Zeitraum von 24 Stunden erscheint im Vergleich unproblematisch. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.4.1).

### **4.7.3 $\Delta$ CT-Vergleich der Hautmodelle (Leerformulierung) mit isolierter menschlicher RNA**

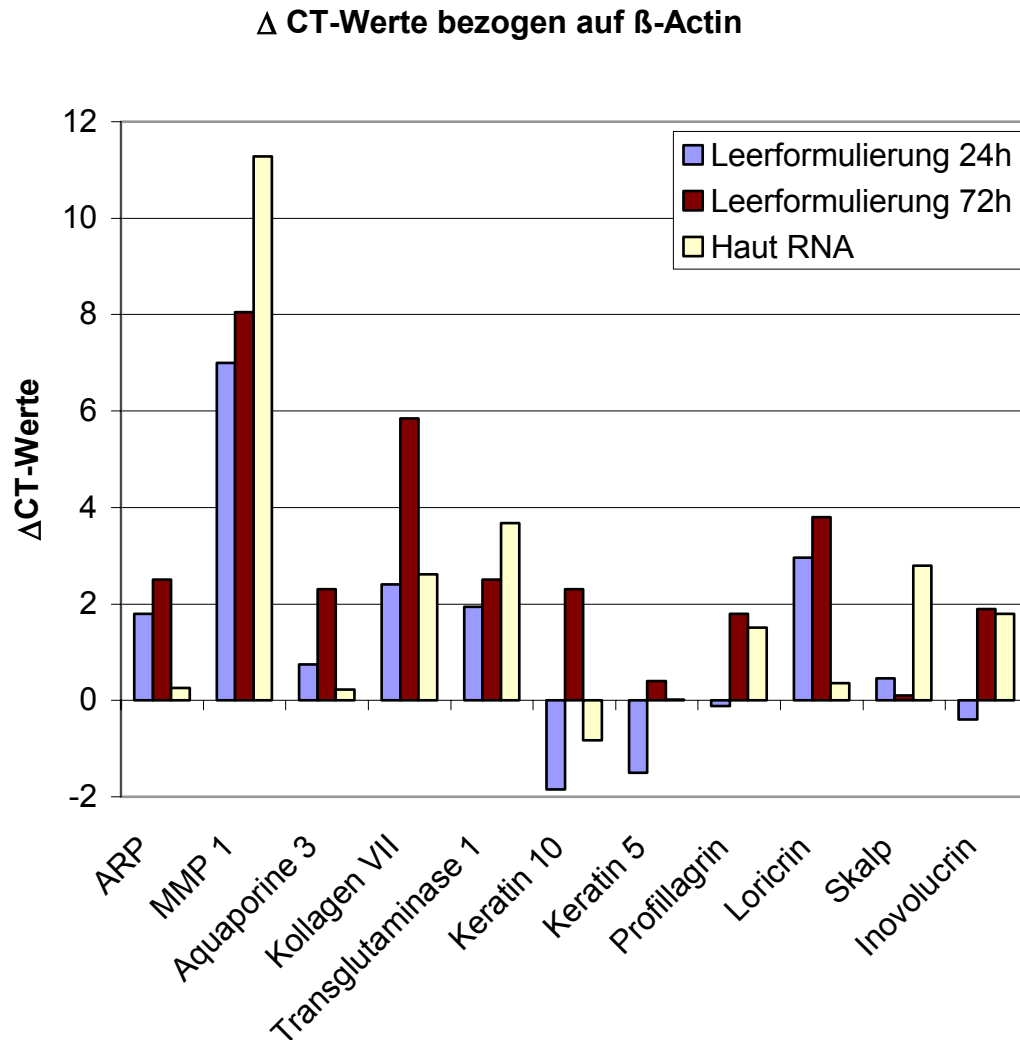
Die aus den Hautmodellen isolierte RNA (Leerformulierung 24h und 72h) wird mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend können ausgesuchte Transkripte mit der RT-PCR bestimmt werden. Die Quantifizierung der Transkriptmenge beruht nicht auf absoluten Mengen an gebildetem PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der Produktbildung (Kapitel 2.8.2).

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder CT-Wert. Dieser Wert benennt jenen PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatkonzentration im Reaktionsgefäß normalerweise nicht detektierbar ist. Dafür nimmt man als Richtlinie den  $\Delta$ CT-Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR noch keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nucleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR durch Bildung bestimmter Produkte gibt.

Als interner Vergleichsstandard wird  $\beta$ -Actin ausgewählt und die Expression ( $\Delta$ CT-Werte) der isolierten RNA aus den Hautmodellen mit der kommerziell erhältlichen Haut-RNA menschlichen Ursprungs (Hautstandard) verglichen. Als zusätzliche interne Referenz wird die Expression des ribosomalen Proteins ARP betrachtet. Durch den Vergleich der Werte der Hautmodelle nach 24 und 72 Stunden mit den Expressionswerten aus der Haut soll geprüft werden, ob die zellbiologischen Zustände der Haut *in vitro* in Hautmodellen abgebildet werden kann.

Zur Validierung werden die  $\Delta$ CT-Werte der 24- und 72-Stundenbestimmung der mit Leerformulierung behandelten Hautmodelle mit Hautstandard verglichen. Die  $\Delta$ CT-Werte der Leerformulierungen sowie die  $\Delta$ CT-Werte des Hautstandards sind in Abbildung 47 aufgeführt. Es zeigt sich, dass die  $\Delta$ CT-Werte für einzelne Marker gut übereinstimmen. Die Trends für die Leerformulierungen und den Hautstandard zeigen nur geringe Abweichungen. Die 72-Stunden Werte zeigen jedoch größere Abweichungen bezogen auf den Hautstandard. Es wird davon ausgegangen, dass das Optimum für das eingesetzte Hautmodell für diese

Applikation kleiner als 72 Stunden ist. Hierbei bleibt zu beachten, dass es sich um ein Modell mit zeitlich eingeschränkter Lebensdauer handelt.



**Abbildung 47:** ΔCT-Werte der Hautmodelle (Leerformulierung) nach 24 und 72 Stunden im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Haut-RNA menschlichen Ursprungs (Hautstandard)

Die ΔCT-Werte der Hautmodelle nach Behandlung mit den Leerformulierungen werden in Bezug gesetzt zu den ΔCT-Werte des Hautstandards. Ist die Differenz vom Hautstandard (gelbe Säule, Abbildung 47) und Leerformulierung (blaue bzw. rote Säule, Abbildung 47) kleiner zwei ( $< 2$ ), so ist eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Hautstandard gegeben. Ist die Differenz größer zwei ( $> 2$ ), ist die Übertragbarkeit vom Modell auf menschliche Haut nicht gegeben. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.4.6 und 9.4.7).

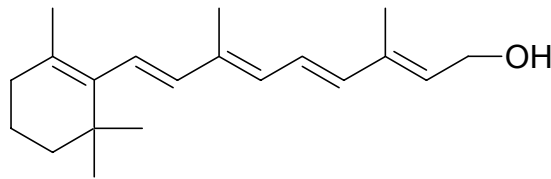
Die Resultate der 24 Stunden- $\Delta$ CT-Werte zeigen für ARP, Aquaporin 3, Kollagen VII, Keratin 10, Transglutaminase 1 und Keratin 5 gute Übereinstimmungen mit dem Hautstandard. Geringere Übereinstimmungen sind für MMP 1, Profilaggrin, Loricrin, Skalp und Involucrin zu beobachten. Für die 72 Stunden-Werte zeigen Keratin 5, Profilaggrin, Involucrin und Transglutaminase 1 gute und ARP, MMP 1, Aquaporin 3, Kollagen VII, Keratin 10, Loricrin und Skalp weniger gute Korellationen.

Die Auswertung dieser Daten ergibt, dass die eingesetzten Hautmodelle nach 24 Stunden die Bedingungen in der Haut deutlich besser nachstellen als nach 72 Stunden. Diese molekularen Daten stimmen mit den physiologischen Daten (Kapitel 4.7.1) gut überein.

Die auf Grundlage der Leerformulierungen erhaltenen Ergebnisse werden im Rahmen der Methodenentwicklung mittels literaturbekannten Wirkstoffs (Retinol) überprüft.

#### 4.7.4 Auswertung der zytotoxischen Untersuchung der Hautmodelle (Vergleichssubstanz: Retinol)

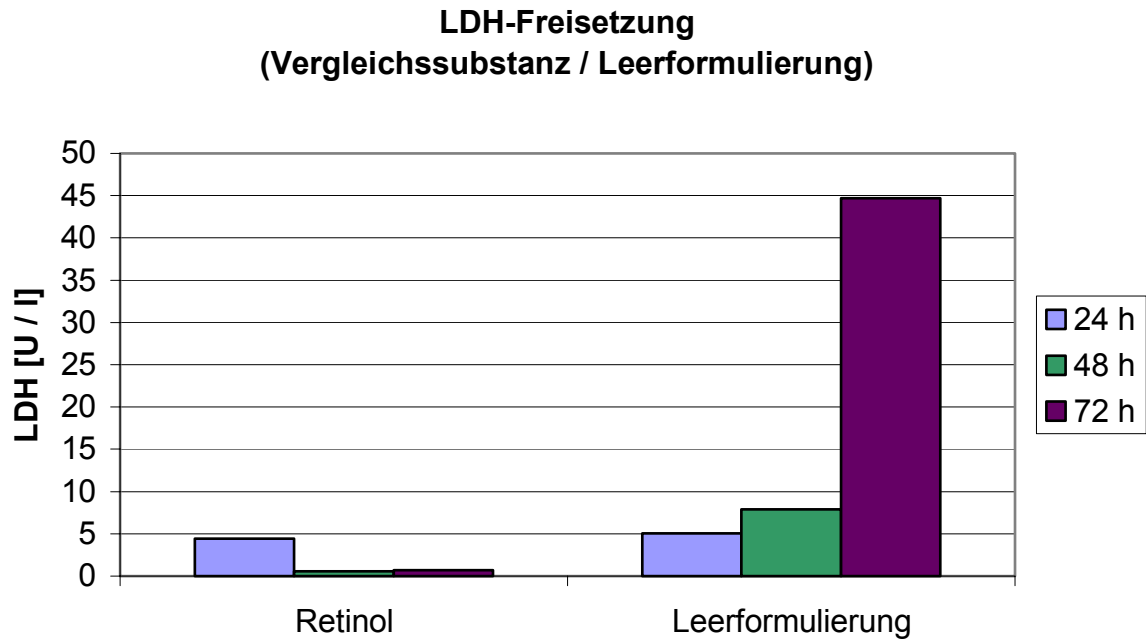
Im Rahmen der Validierung der RT-PCR-Methode werden Versuchsreihen mit Retinol im Vergleich zur Leerformulierung, (siehe Kapitel 4.7.1) durchgeführt. Retinol ist eine in der Literatur in Bezug auf Genregulation gut beschriebene Substanz.



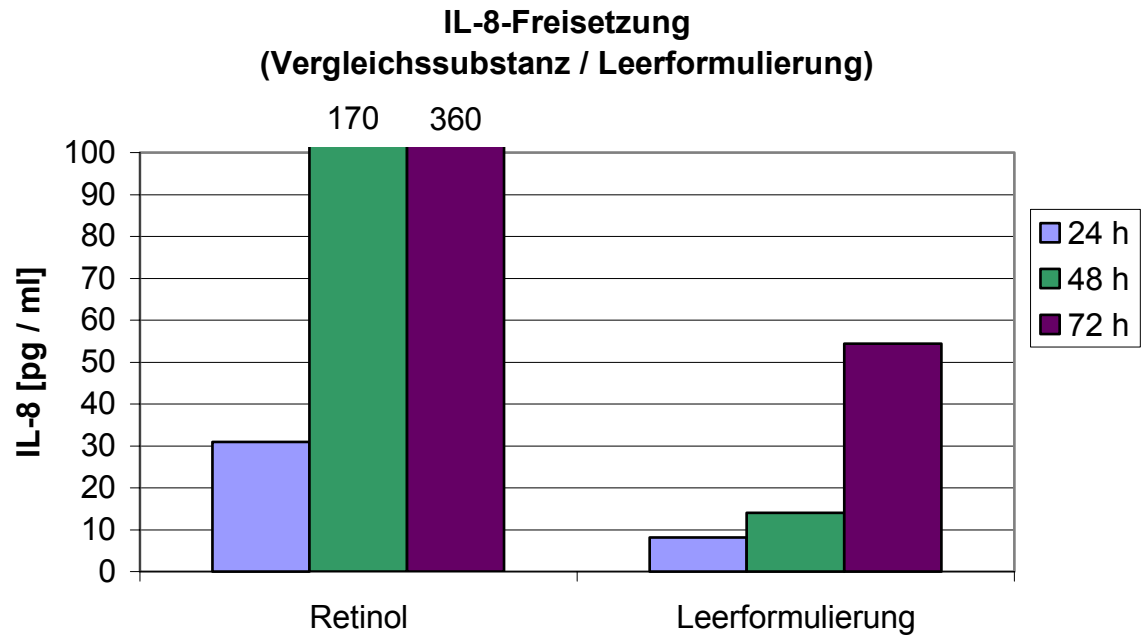
**Abbildung 48:** Struktur von der Vergleichssubstanz Retinol

Es werden Cremeformulierungen wie in Kapitel 3.8 beschrieben hergestellt, für 24 und 72 Stunden auf Hautmodelle appliziert und die zytotoxischen Parameter wie IL-8- und LDH-Freisetzung bestimmt. Anschließend werden die Genexpressionsänderungen im Vergleich zu den Leerformulierungen (Creme ohne Wirkstoff) beobachtet.

Die Ergebnisse der LDH-Freisetzung (Abbildung 49) zeigen nach 72 Stunden im Vergleich zu den Ergebnissen nach 24 bzw. 48 Stunden keine erhöhten Werte. Nach 48 Stunden wird eine Verringerung der LDH-Freisetzung für Retinol beobachtet. Die Änderungen der gemessenen Konzentrationen sind jedoch sehr gering. Die Interleukin-8-Bestimmungen nach 48 und 72 Stunden zeigen im Vergleich zur Leerformulierung höhere Werte (Abbildung 50). Dies bedeutet, dass die Entzündungsreaktionen einsetzen und das proinflammatorische Zytokin IL-8 sezerniert wird.



**Abbildung 49:** LDH Freisetzung in das Kulturmedium der Hautmodelle nach einer Applikationsdauer der Vergleichssubstanz von 24, 48 und 72 Stunden



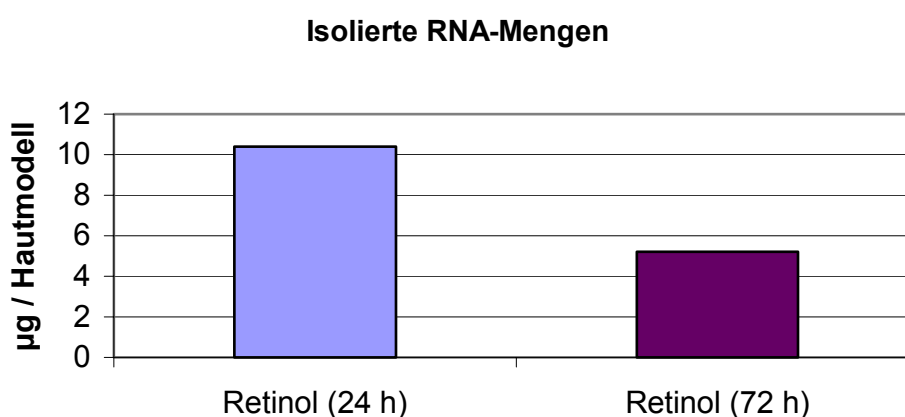
**Abbildung 50:** Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) in das Kulturmedium nach einer Applikationsdauer der Vergleichssubstanz von 24, 48 und 72 Stunden

### 4.7.5 Isolierte RNA-Mengen der Hautmodelle (Vergleichssubstanz)

Aus den mit Cremeformulierungen (Vergleichssubstanz: Retinol) behandelten Hautmodellen (Kapitel 4.7.4) wird nach 24 bzw. 72 Stunden die total-RNA isoliert und ihre Menge photometrisch bestimmt. Die isolierten total-RNA-Mengen sind ein Indikator für den Viabilitäts- und Differenzierungszustand der Zellen, wobei die Transkriptionsaktivität als ein Maß für die Lebendigkeit der Zellen gesehen werden kann.

**Tabelle 18:** Isolierte RNA-Mengen aus den mit Retinol behandelten Hautmodellen, Angaben der total RNA in  $\mu\text{g}/\text{Hautmodell}$  ( $0,5 \text{ cm}^2$ )

Probennummer	Mittelwert (n = 3) total RNA [Ø]
Retinol (24h)	10,4
Retinol (72h)	5,2



**Abbildung 51:** Aus den mit Retinol behandelten Hautmodellen nach 24 und 72 stündiger Applikationsdauer isolierte RNA-Mengen

Die Ergebnisse für die total-RNA-Mengen sind mit denen aus den Leerformulierungen (Abbildung 46) vergleichbar, auch hier liegt der 72-Stunden-Wert an total-RNA unter dem 24-Stunden-Wert (Kapitel 4.7.2). Die Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.4.1 - 9.4.4).

### 4.7.6 PCR Auswertung der Hautmodelle (Vergleichssubstanz)

Die Kombination von Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht es, die Genexpressionen auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Dabei können auch mRNA-Moleküle

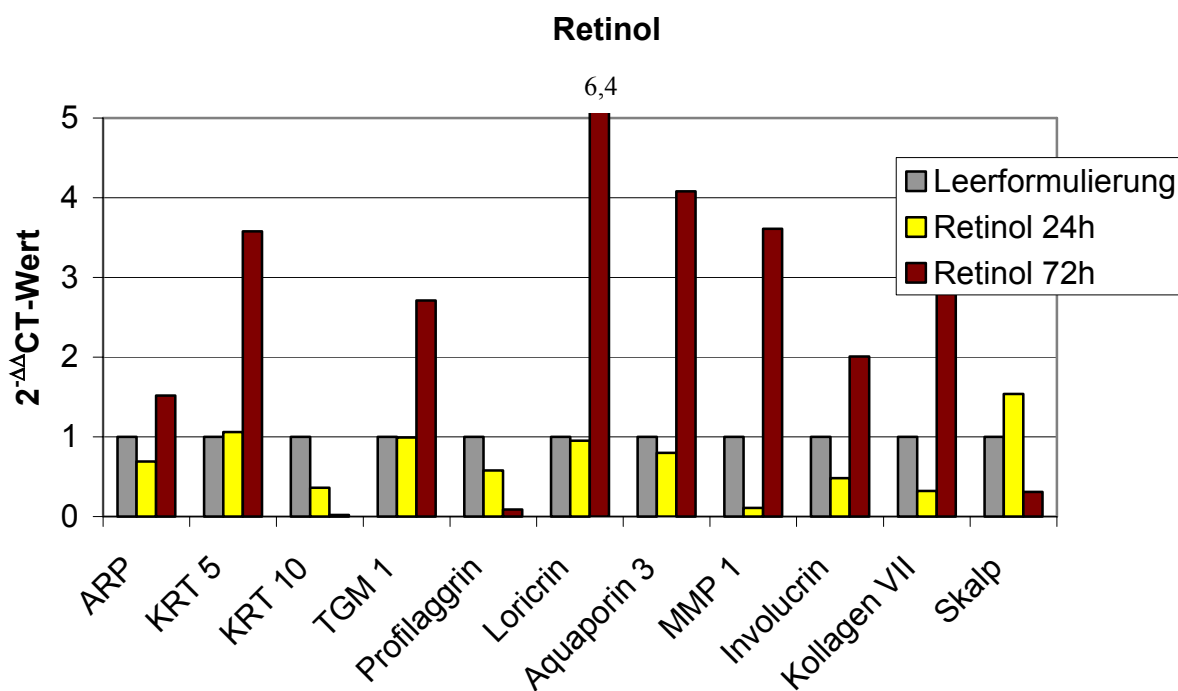
nachgewiesen werden, die nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind. Nachdem die mRNA mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben ist (Kapitel 3.9.2), wird diese in einer PCR-Analyse mit verschiedenen Primern (Tabelle 9 und 10) amplifiziert. Hierbei spielt die Wahl und Ausführung von Kontrollexperimenten in der Beurteilung molekularbiologischer Forschungsergebnisse eine wichtige Rolle. Als weitverbreitetes Kontroll- bzw. Referenzgen dient  $\beta$ -Actin. Das  $\beta$ -Actin, das in der Literatur als sogenanntes Haushaltsgen (house keeping gene) beschrieben ist, wird in vielen Zellen und Geweben auf relativ konstantem Niveau exprimiert, da es für die grundlegenden Prozesse (Homöostase) jeder Zelle notwendig ist [Thellin et al.; 1999]. Da man von einer relativ stabilen Expressionsrate der einzelnen Haushaltsgene ausgeht, werden sie in zahlreichen Verfahren zur Untersuchung von Genexpressionen als interner Standard eingesetzt [Thellin et al., 1999; Sambrook und Russel, 2001]. Dabei wird die Expressionsrate des zu untersuchenden Gens in Relation zu der des Haushaltsgens gesetzt [Thellin et al., 1999]. Idealerweise sollte ein interner Standard in verschiedenen Geweben auf gleichbleibendem Niveau exprimiert werden und zwar unabhängig von externen Einflüssen [Bustin, 2000]. Die  $\beta$ -Actin-Kontrolle ist somit eine generelle Kontrolle für den Erfolg der Reaktion und ein Referenzpunkt für die Stärke der Genexpression.

Die Analysen zeigen für die einzelnen Markergene durchaus die erwarteten Ergebnisse. Ein entscheidender Einfluss wird für die Dauer der Applikation von 24 und 72 Stunden beobachtet. Die Ergebnisse nach 72-Stunden belegen die Annahme, dass nach dieser Applikationszeit die Lebensdauer der Hautmodelle überschritten ist. Belegt wird diese Aussage durch die Vielzahl von induzierten Markern in der 72-stündigen Testreihe. Nach einer Wirkdauer von 24 Stunden sind nahezu keine Expressionsveränderungen der Marker zu beobachten. Dies bedeutet, dass die Applikationsdauer von 24 Stunden für detektierbare Expressionsveränderungen nicht ausreichend ist und nach 72 Stunden die Vitalität der Hautmodelle nicht gesichert ist. Die Ergebnisse nach 24 und 72 Stunden für die einzelnen Primer sind in der nachfolgenden Abbildung (Tabelle 19 und Abbildung 52) aufgeführt. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.4.8).



**Tabelle 19:** Nach Einwirkung von Retinol induzierte (I), reprimierte (D) und nicht veränderte (NC) Marker nach der RT-PCR Messung für eine Applikationszeit von 24 und 72 Stunden

Marker	Retinol (24 h)	Retinol (72 h)
Transglutaminase 1	NC	I
Loricrin	NC	I
Profilaggrin	NC	D
Involucrin	NC	NC
Keratin 10	NC	D
Keratin 5	NC	I
Skalp	NC	D
Kollagen VII	NC	I
MMP 1	D	I
Aquaporin 3	NC	I



**Abbildung 52:** Veränderung der Genexpression von Hautmodellen, nach Einwirkzeit von 0,2 % Retinol für 24 und 72 Stunden im Vergleich zur Leerformulierung, die jeweils auf den Wert 1 gesetzt wird

Die mit Retinol nach einer Applikationsdauer von 24 Stunden erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zu den Ergebnissen der Leerformulierung keine nennenswerten Expressionsveränderungen zu erkennen sind. Die Marker werden ab einem  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von 3 als markant induziert (I) und ab einem  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von 0,33 als reprimiert (D) definiert. Nach einer Applikationszeit von 72 Stunden zeigt sich ein uneinheitliches Bild für die Differenzierungsmarker. Eine Induzierung ist bei der Transglutaminase 1 und dem Loricrin zu beobachten, dagegen eine Reprimierung bei Profilaggrin und Keratin 10. Dies bedeutet, dass von den fünf untersuchten Differenzierungsmarkern zwei induziert, zwei reprimiert und einer unverändert vorliegen. Es wäre eigentlich zu erwarten, dass bei allen Differenzierungsmarkern eine einheitliche Expressionsveränderung beobachtet wird. Da die Differenzierungsmarker uneinheitliche Expressionsveränderungen zeigen, ist mit einer Applikationsdauer von 72 Stunden die Lebensdauer der Hautmodelle überschritten. Bei den Markern Keratin 5, Kollagen VII, Aquaporin 3 und MMP 1 wird ebenfalls eine Induzierung beobachtet.

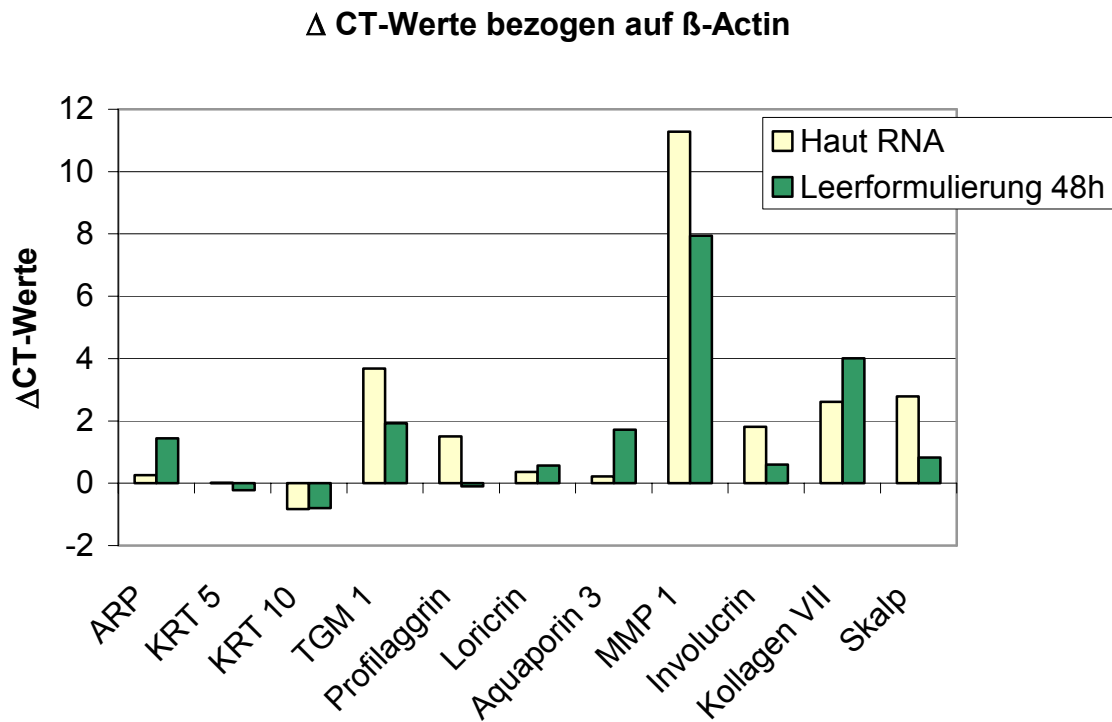
Werden nach 24 Stunden nahezu keine Expressionsänderungen beobachtet, werden auch nach einer Applikationszeit von 72 Stunden keine eindeutigen Trends in der Expressionsänderungen sichtbar. Die vergleichende Auswertung der Ergebnisse aus den 24- und 72-Stunden-Untersuchungen mit Leerformulierungen und Retinol ergeben ein übereinstimmendes Bild. Es zeigt sich, dass im Rahmen der Methode die Dauer der Applikation die entscheidende Einflussgröße ist. Für jedes einzelne Teilergebnis ergibt sich dann das Optimum für die Dauer der Applikation, welches bei 72-Stunden Applikationszeit oft schon überschritten, bei 24-Stunden aber noch nicht erreicht ist.

Das Optimum der Applikationsdauer liegt somit zwischen 24 und 72 Stunden. Auf dieser Grundlage wird eine Applikationszeit von 48 Stunden festgelegt und in nachfolgenden Versuchen überprüft.

## **4.8 $\Delta CT$ Vergleich der Hautmodelle (48 Stunden / Leerformulierung) mit isolierter menschlicher RNA**

Zur Überprüfung werden die Hautmodelle nach einer Applikationszeit von 48 Stunden wie in Kapitel 4.7.3 beschrieben analysiert. Die  $\Delta CT$ -Werte für die Leerformulierungen (Definition siehe Kapitel 7) werden mit menschlicher Haut-RNA als Standard verglichen (Abbildung 53). Die  $\Delta CT$ -Werte der Marker zeigen im Rahmen der Untersuchung gleiche Trends und nur

geringe Abweichungen. Die  $\Delta$ CT-Werte der Leerformulierung von 24 und 72 Stunden ergeben verglichen mit den Werten nach 48 Stunden unterschiedlich große Abweichungen zur Referenz Haut-RNA. Daraus ergibt sich, dass die Applikationsdauer von 48-Stunden für die nachfolgenden Untersuchungen die geeignete Testdauer ist.



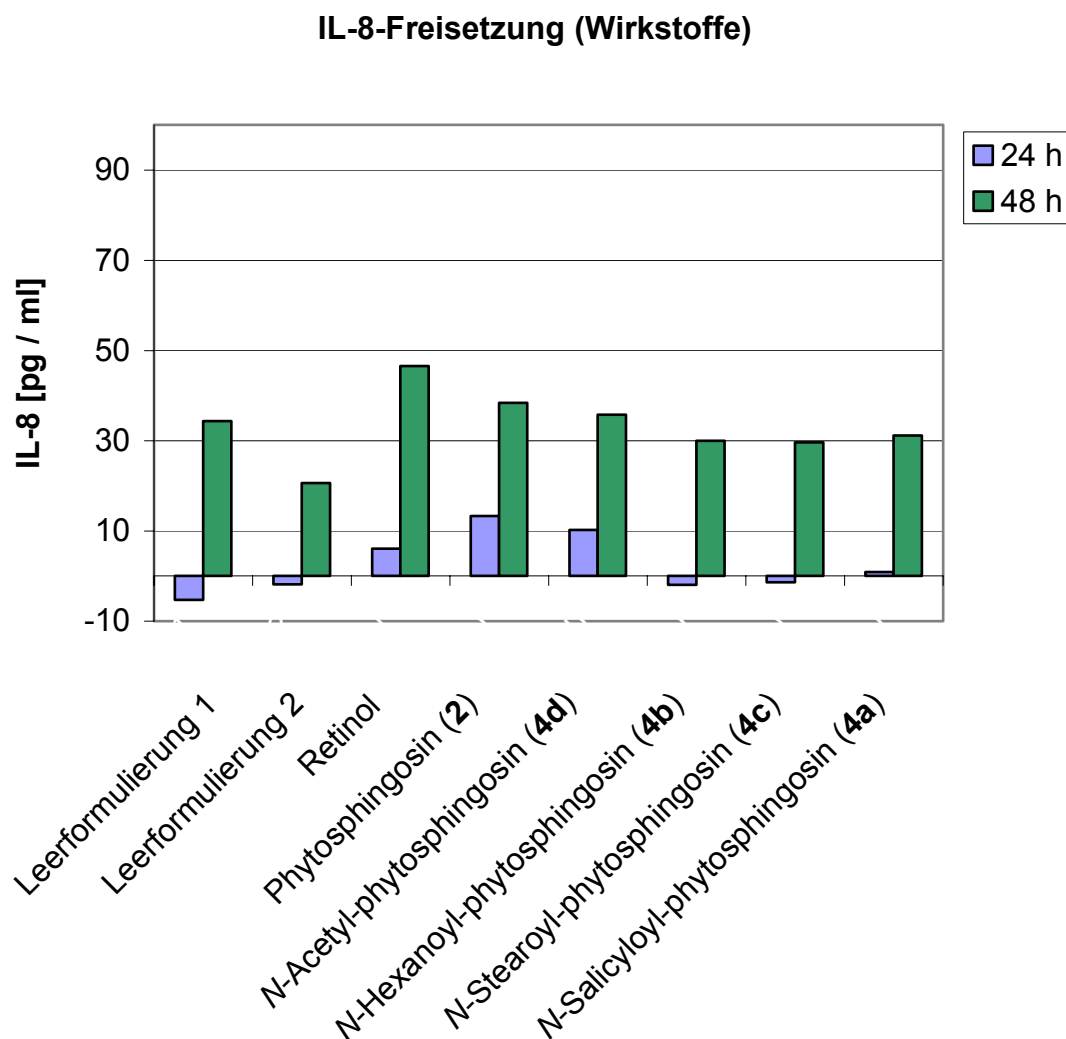
**Abbildung 53:**  $\Delta$ CT-Vergleich der Hautmodelle (Leerformulierung) mit isolierter menschlicher Haut-RNA nach einer Applikationsdauer von 48 Stunden

Die  $\Delta$ CT-Werte nach 48 Stunden zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Werten der Haut-RNA sowohl bei der Induzierung als auch bei der Reprimierung. Lediglich beim Marker MMP 1 ist ein  $\Delta$ CT-Unterschied  $> 2$   $\Delta$ CT-Werte zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten ableiten, dass das Testsystem Hautmodell nach 48 Stunden die Bedingungen in der Haut deutlich besser abbildet als nach 24 oder 72 Stunden. Somit wird für die nachfolgenden Untersuchungen der Wirkstoffe die Applikationszeit auf 48 Stunden festgelegt.

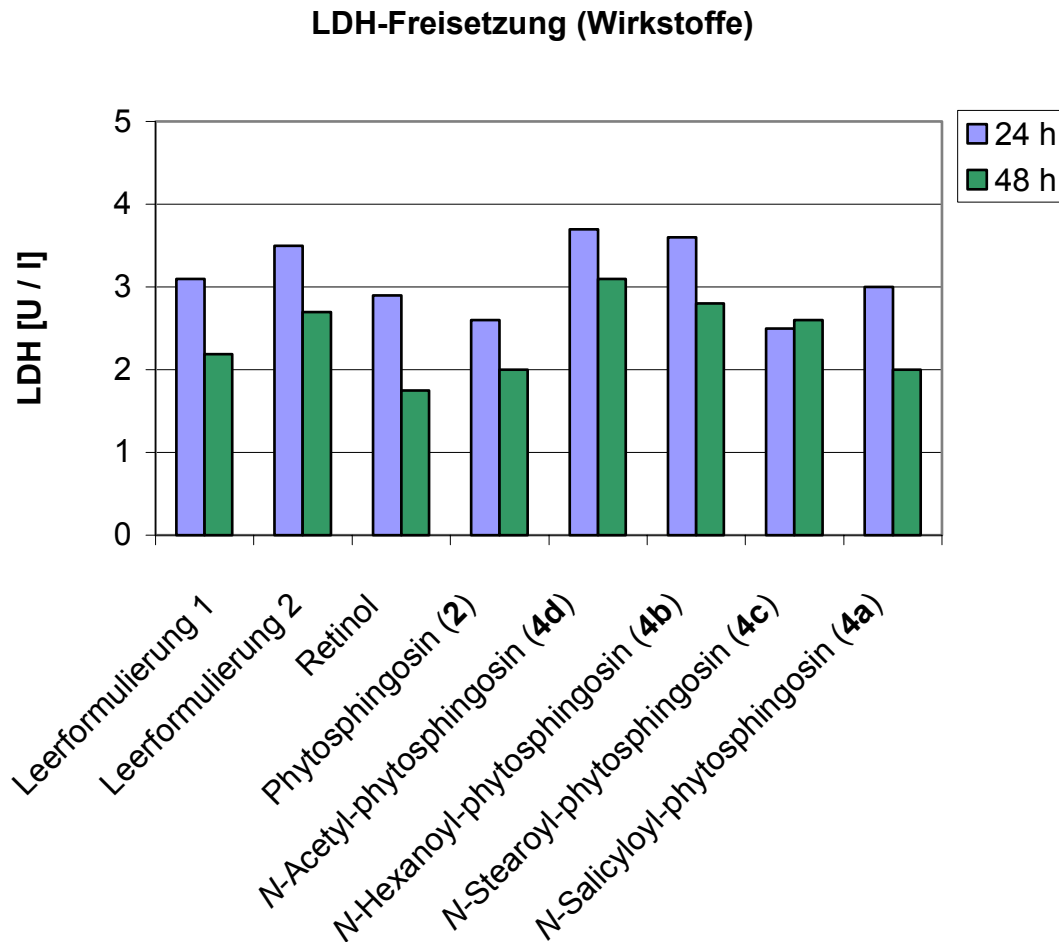
## **4.9 Auswertung der zytotoxischen Bestimmung der Hautmodelle (Wirkstoffe)**

Die Ergebnisse aus der Validierung der Methode werden nun auf die Untersuchungen der Wirkstoffe angewendet. Nach der Behandlung der Hautmodelle mit den Wirkstoffen wird ihr Status anhand der Zytotoxizitätsparameter (Interleukin-8- und LDH-Freisetzung) des Kulturmediums bestimmt. Im Rahmen der Untersuchung werden drei Hautmodelle eingesetzt, die Gesamtversuchsdauer für diese Modelle beträgt 48 Stunden, wobei jedoch nach 24 und 48 Stunden die Interleukin-8- und LDH-Freisetzung im Kulturmedium bestimmt werden. Anschließend werden diese Hautmodelle aufgearbeitet und Veränderungen im Genexpressionsmuster durch die RT-PCR-Methode untersucht.

Die Interleukin-8-Bestimmung zeigt nach 48 Stunden gegenüber 24-Stunden leicht erhöhte Werte (Abbildung 54). Die Werte der Leerformulierungen liegen dennoch deutlich unter denen nach 72 Stunden (Abbildung 45). Bei der LDH-Freisetzung (Abbildung 55) zeigt sich bei den 48 Stunden-Werten eine Abnahme sowohl zu den 24 Stunden-Werten als auch zu den Leerformulierungen nach 72 Stunden (Abbildung 44). Die Daten sagen im Vergleich zu den 72 Stunden-Werten aus, dass die Applikation Phytosphingosin (2) basierter Wirkstoffe auf die Hautmodelle keine zytotoxische Wirkung und auch keine Entzündungsreaktion hervorrufen.



**Abbildung 54:** Freisetzung von Interleukin-8 in das Kulturmedium nach einer Applikationsdauer von 48 Stunden



**Abbildung 55:** LDH-Freisetzung in das Kulturmedium nach einer Applikationsdauer von 48 Stunden

#### 4.10 Bestimmung der total-RNA Mengen aus dem Hautmodell (Wirkstoffe)

Nach Ablauf der Verweilzeit der Testsubstanzen auf den Hautmodellen wird die RNA herausgelöst und photometrisch bestimmt. Die isolierten Mengen an total-RNA nach einer Applikationsdauer von 48 Stunden (Abbildung 56) sind geringer als die total-RNA Mengen nach einer Applikationsdauer von 24 Stunden (Abbildung 46).

Dies bedeutet, dass die Ergebnisse der Untersuchung mit einer Applikationsdauer von 48 Stunden mit den Ergebnissen nach 24 und 72 Stunden zusammenpassen. Es wird

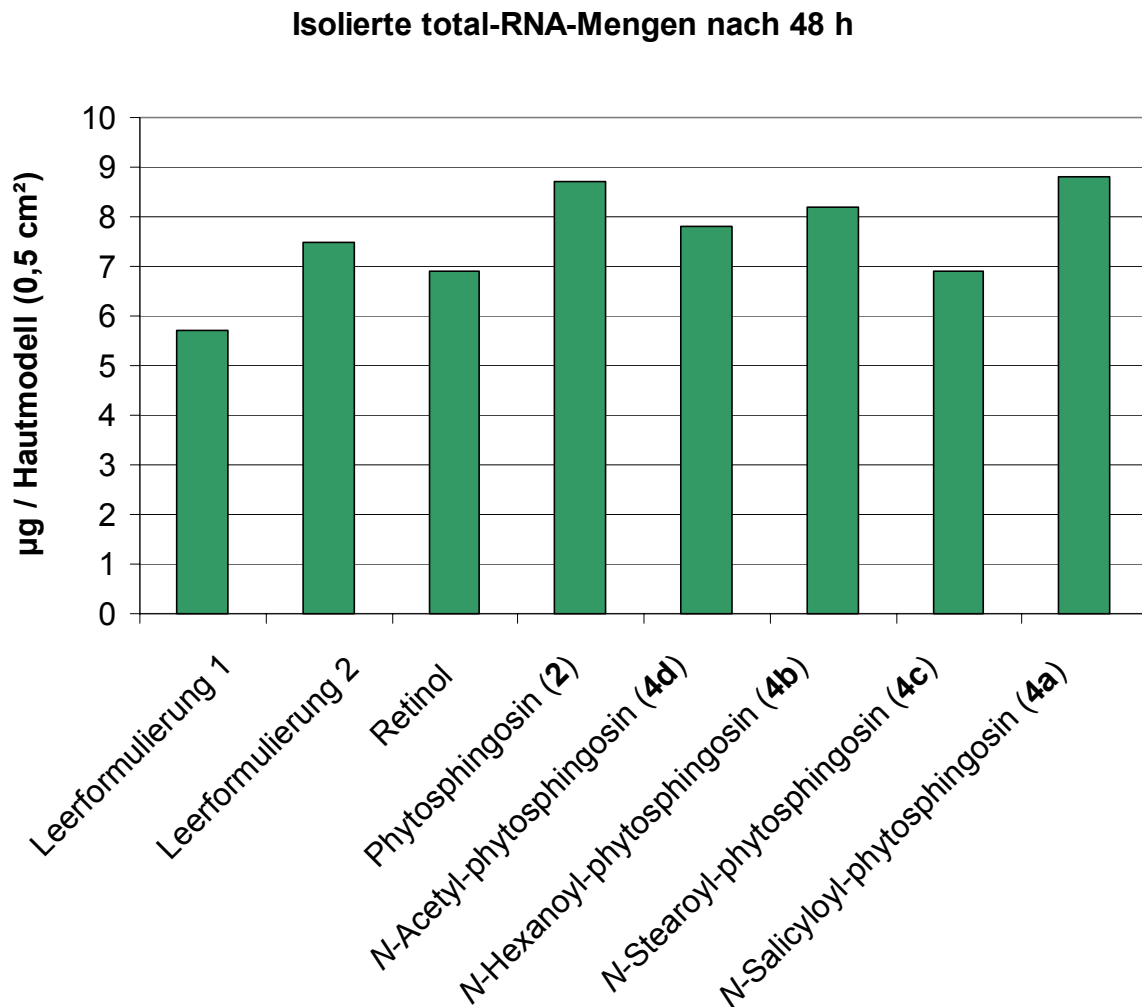
beobachtet, dass die Menge an isolierter total-RNA mit zunehmender Applikationsdauer der Wirkstoffe auf den Hautmodellen abnimmt. Im Rahmen der Methode gilt es verschiedene Parameter festzulegen. Nachfolgend muss ein Kompromiss zwischen Dauer der Applikation und Vitalität des Hautmodells gefunden werden. Im Fall der maximalen Applikationsdauer (72 Stunden) beträgt die Menge an isolierter total-RNA weniger als die Hälfte bezogen auf die isolierten Mengen nach einer Applikationsdauer von 24 Stunden. Somit ergibt sich bei einer Applikationsdauer von 48 Stunden ein Kompromiss für beide Parameter. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.4.3).

**Tabelle 20:** Isolierte total-RNA Mengen aus den Hautmodellen nach einer Applikationszeit von 48 Stunden, Angaben der total RNA in  $\mu\text{g}/\text{Hautmodell}$  ( $0,5\text{ cm}^2$ )

Probennummer (48h)	Mittelwert (n = 3) total RNA [ $\mu\text{g}$ ]
Leerformulierungen 1	5,7
Leerformulierungen 2	7,5
Retinol	6,9
Phytosphingosin (2)	8,7
N-Acetyl-phytosphingosin (4d)	7,8
N-Hexanoyl-phytosphingosin (4b)	8,2
N-Stearoyl-phytosphingosin (4c)	6,9
N-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	8,8

**Tabelle 21:** Gegenüberstellung der Mittelwerte (n = 3) der total RNA [ $\mu\text{g}$ ] nach 24, 48 und 72 Stunden Applikationsdauer

	Probennummer (24h)	Probennummer (48h)	Probennummer (72h)
Retinol	10,4	6,9	5,2
Leerformulierungen 1 und 2	12,8	5,7 / 7,5	2,4



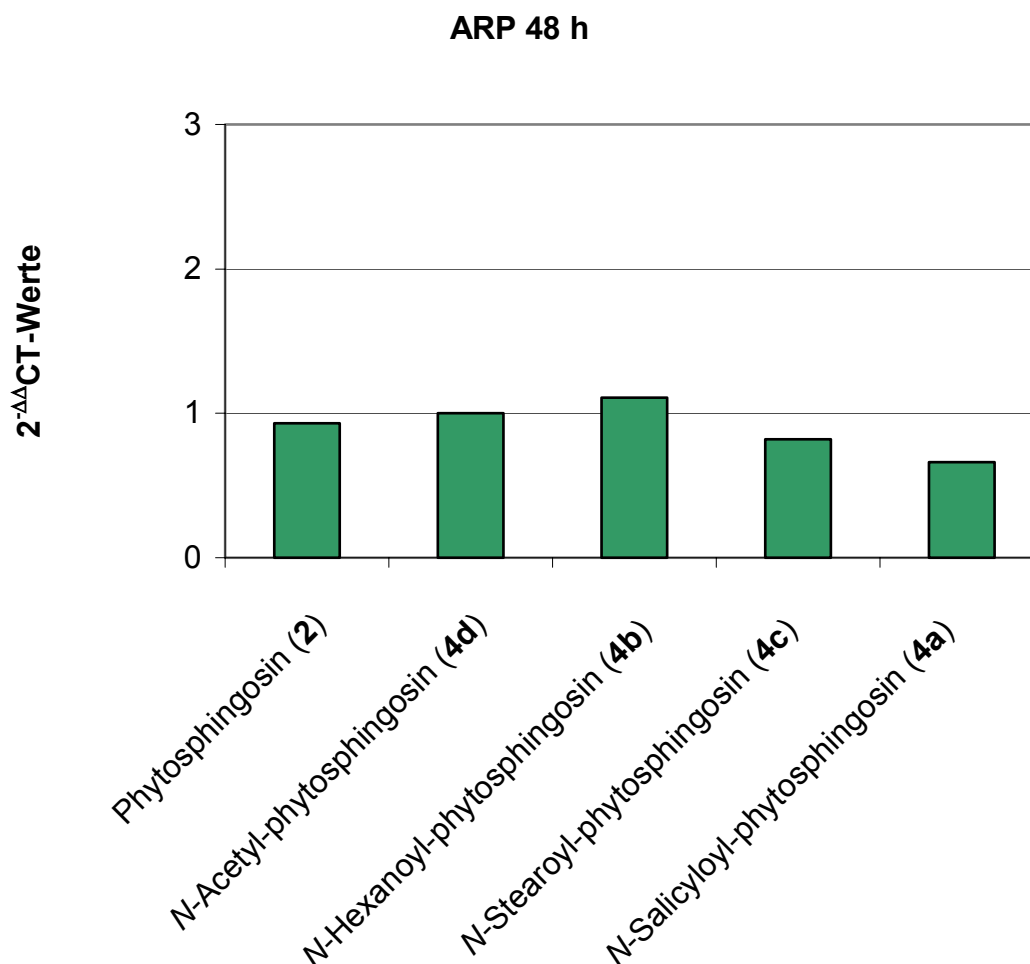
**Abbildung 56:** Isolierte RNA-Mengen aus den Hautmodellen nach einer Applikationszeit von 48 Stunden (Tabelle 20)

#### 4.10.1 Methodenkontrolle durch Berechnung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Werte ausgewählter Marker (ARP und $\beta$ -Actin)

Zur Überprüfung der Methode wird die Expression von zwei unabhängigen Genen (mit gleicher Expression) miteinander verglichen. Wie in Kapitel 4.7.6 beschrieben, wird als Referenzgen dafür  $\beta$ -Actin ausgewählt. Aufgrund der mit dem  $\beta$ -Actin vergleichbaren Expressionraten wird das Markergen ARP analysiert. Wenn für beide Gene gleiche Expressionswerte in der Untersuchung gemessen werden (identische Expression), ergibt sich für den  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Wert ein Wert von 1,0 (Berechnung siehe Anhang Kapitel 9.4.5). In Abbildung 57 sind die Werte der Methodenüberprüfung für die Wirkstoffe dargestellt. Es ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem internen Standard " $\beta$ -Actin" und dem



ausgewähltem Marker ARP. Daraus ist zu schließen, dass die Verwendung des  $\beta$ -Actins als interner Standard eine ausreichende Genauigkeit bietet. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 9.4.9).



**Abbildung 57:** Methodenkontrolle durch Berechnung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Werte der Marker ARP und  $\beta$ -Actin

#### 4.10.2 PCR-Auswertung der Hautmodelle (Wirkstoffe)

In den nachfolgenden Diagrammen (Abbildung 63) werden die Ergebnisse der Wirkstoffapplikation auf den Hautmodellen dargestellt. Sie werden auf die für die Leerformulierung erhaltenen Werte bezogen. Der entsprechende Wert aus den Untersuchungen der Leerformulierung wird in dieser Auswertung gleich eins gesetzt. Versuchsansätze hingegen, die keine reproduzierenden Resultate lieferten, wurden nicht berücksichtigt.

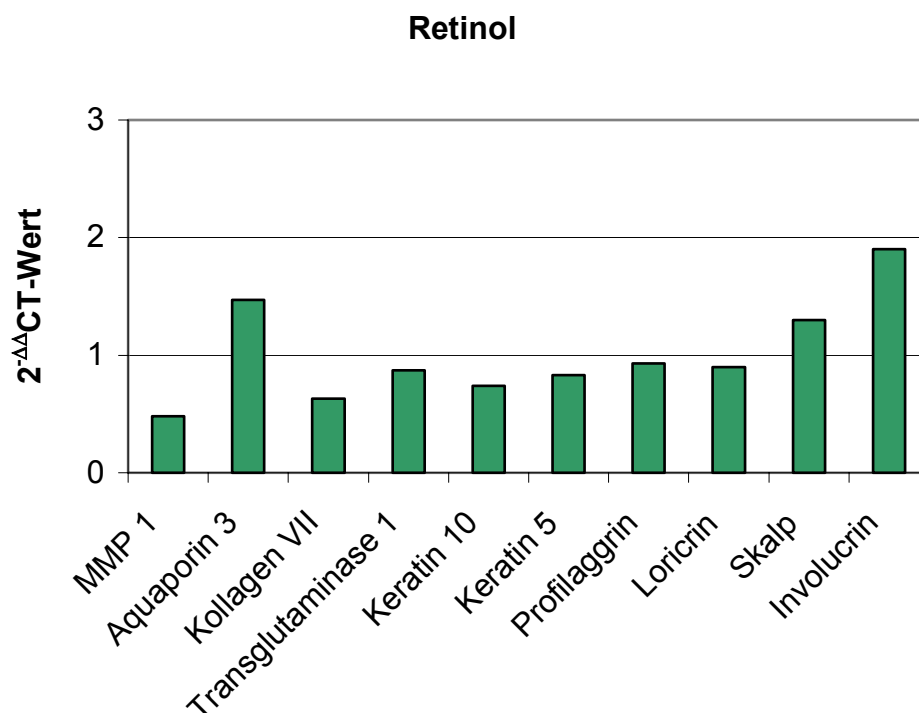
**Tabelle 22:** Induzierte und reprimierte Marker der Testsubstanzen nach einer Applikationszeit von 48 Stunden

Marker	Retinol	PS (2)	PS-C2 (4d)	PS-C6 (4b)	PS-C18 (4c)	PC-SLC (4a)
Transglutaminase 1	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Loricrin	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Profilaggrin	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Involucrin	NC	I	NC	NC	NC	I
Keratin 10	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Keratin 5	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Skalp	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Kollagen VII	NC	NC	NC	I	NC	NC
MMP 1	NC	NC	D	NC	NC	NC
Aquaporin 3	NC	NC	NC	NC	NC	NC

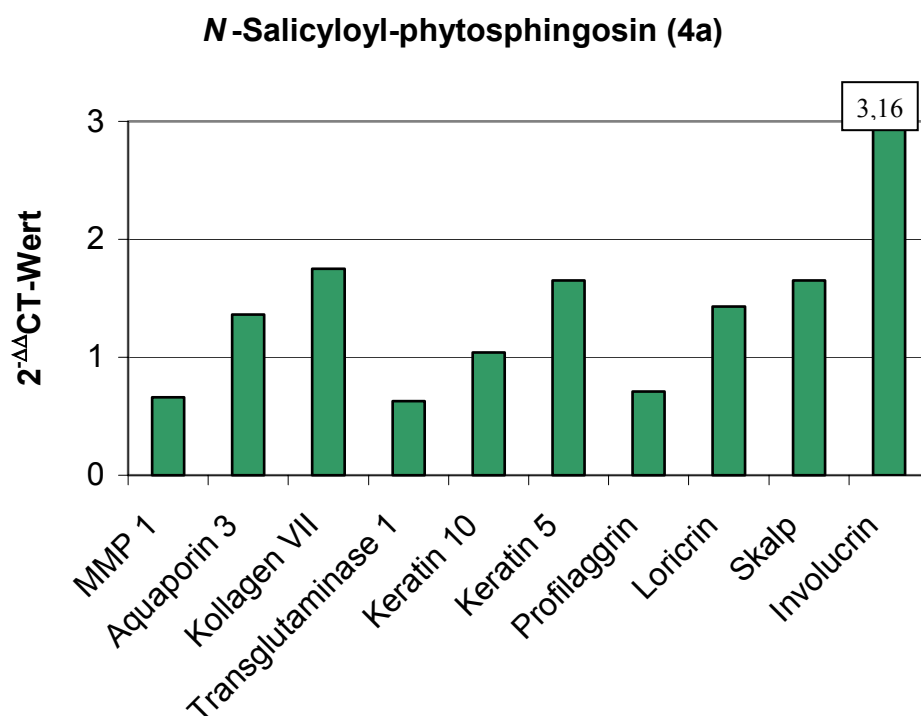
Die Reprimierung bzw. Induzierung der Expression der Markergene ist für jede der Testsubstanzen selektiv, es finden sich nicht immer bestimmbare Effekte für alle Marker. Diese Methode unterscheidet nicht nur zwischen Reprimierung und Induzierung, sondern verknüpft die Aussagen auch mit dem Einfluss der Leerformulierung auf die Marker. Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse eine Induzierung des Differenzierungsmarkers Involucrin nach einer Behandlung mit den Verbindungen *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) (Abbildung 59) und Phytosphingosin (**2**) (Abbildung 61), sowie eine Induzierung des Markers Kollagen VII für das *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) (Abbildung 63). Eine Reprimierung wird beim Marker MMP 1 für das *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) (Abbildung 62) beobachtet. Die Verbindungen *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) (Abbildung 60) und Retinol (Abbildung 58) zeigen für alle untersuchten Primern keine Änderung der Expression.

Aus diesen RT-PCR-Ergebnissen ergibt sich eine Induzierung der Differenzierungsmarker durch das Phytosphingosin (**2**), welche mit den Daten der DNA-Chip-Analyse vergleichbar sind. Ebenso konnte eine Induzierung der Differenzierungsmarker durch die Verbindung *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) in der DNA-Chip-Analyse nachgewiesen werden. Der Marker MMP 1 zeigt in der DNA-Chip-Analyse eine Induzierung durch die Verbindung *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**), in der RT-PCR wird jedoch eine Reprimierung beobachtet. Für das *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) wird bei der DNA-Chip-Analyse eine Induzierung der Differenzierungsmarker jedoch keine Induzierung des Markers Kollagen VII beobachtet. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Ergebnisse der zwei Modelle (Keratinocyten / DNA-Chip und Hautmodelle / RT-PCR) nur bedingt miteinander vergleichbar sind. Bei der Testung von Substanzen zur Aufklärung u.a. der toxischen Effekte

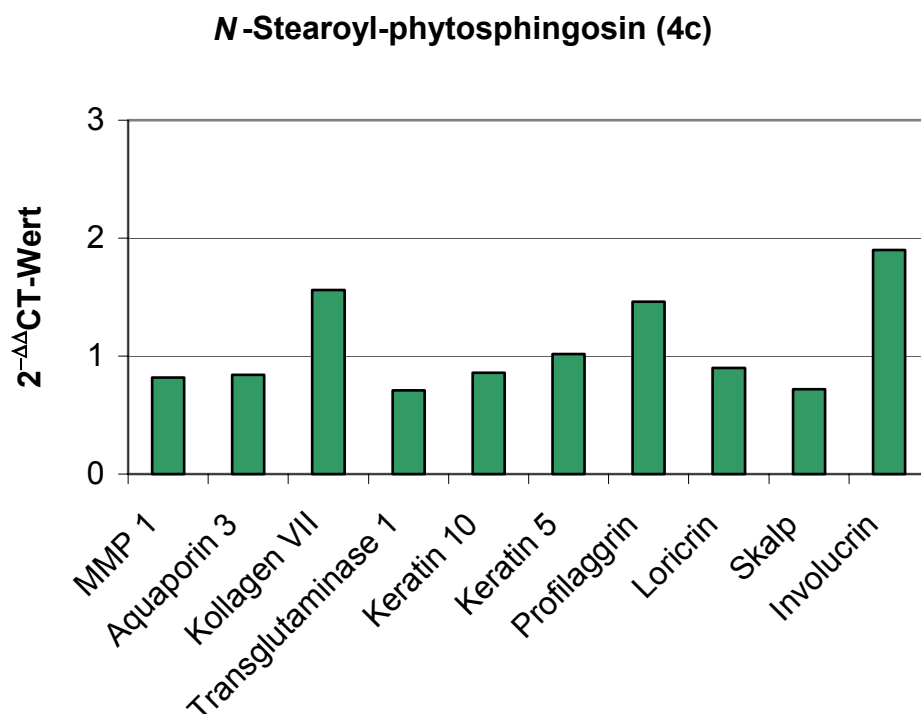
auf molekularer Ebene sind Modelle von Vorteil, die sich durch Einfachheit und Überschaubarkeit auszeichnen. Deshalb sind Einzelsysteme bevorzugt, die mit Standardgewebekulturtechnik erhalten werden. Für die Vorhersagbarkeit der Wirksamkeit für eine Substanz *in vivo* ist ein solches Modell allerdings nur von orientierender Bedeutung, da den komplexen physiologischen Verhältnissen in keiner Weise Rechnung getragen wird. In erste Linie mangelt es den Modellsystemen an charakteristischen Eigenschaften intakter Haut, z. B. an der Hornschichtbarriere und an Interaktion unterschiedlicher Zellen.



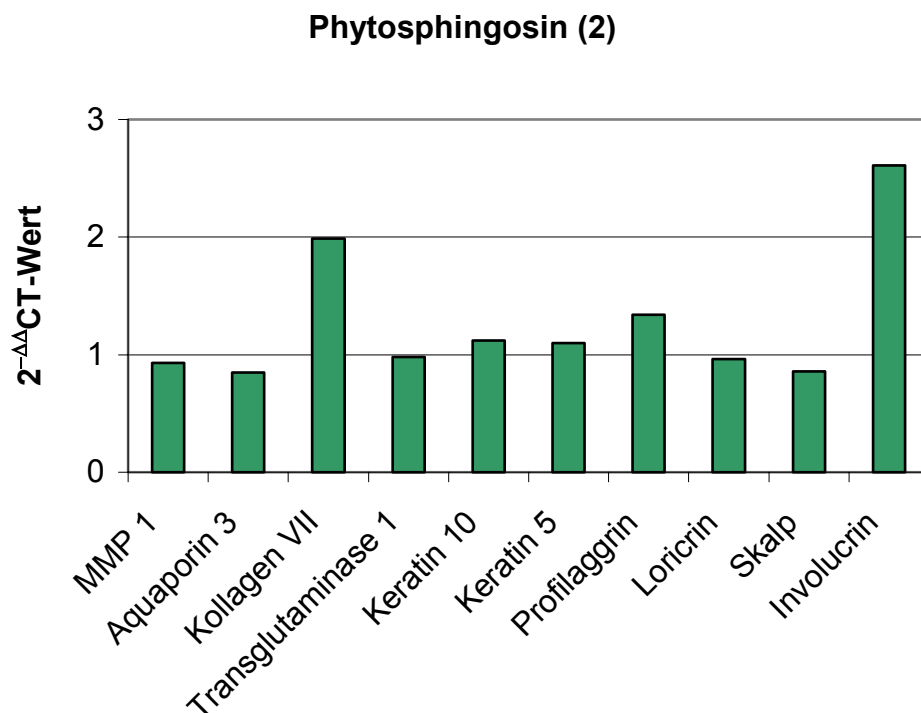
**Abbildung 58:** Darstellung der berechneten  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Werte für Retinol



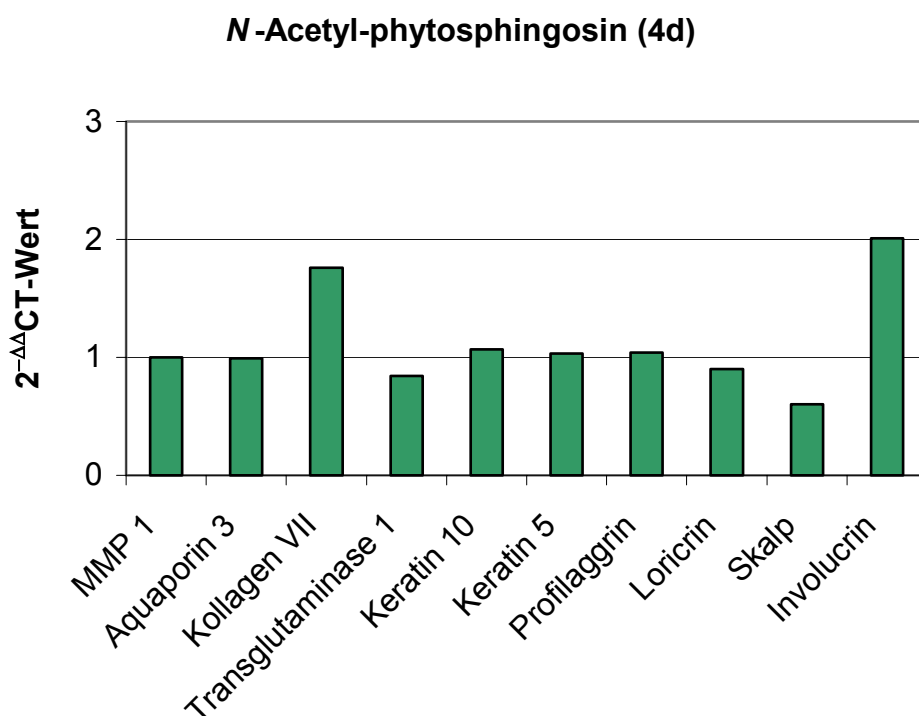
**Abbildung 59:** Darstellung der berechneten  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Werte für *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)



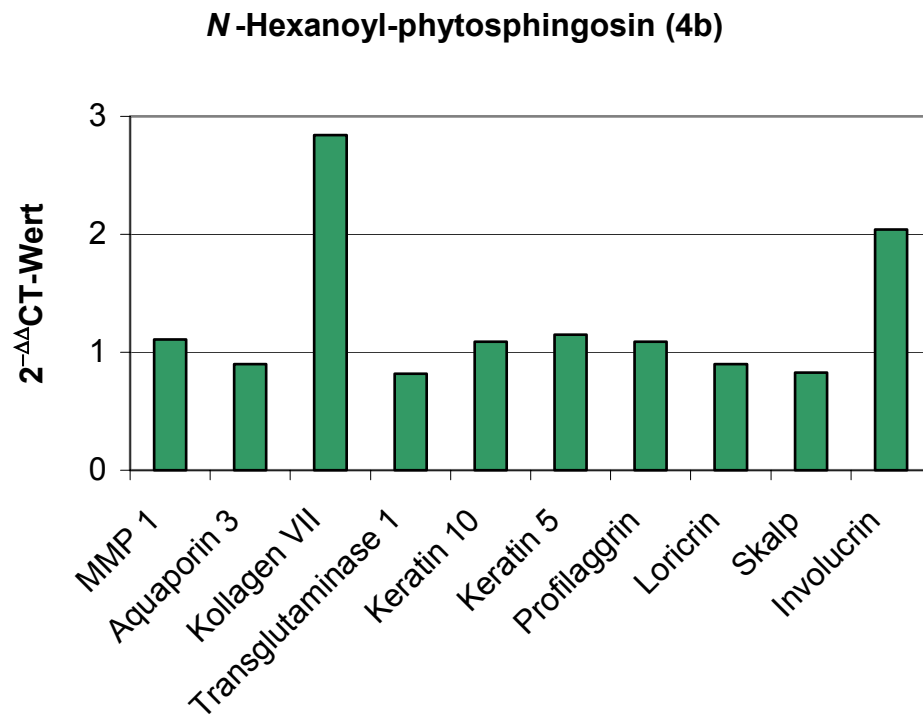
**Abbildung 60:** Darstellung der berechneten  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Werte für *N*-Stearoyl-phytosphingosin (4c)



**Abbildung 61:** Darstellung der berechneten  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Werte für Phytosphingosin (2)



**Abbildung 62:** Darstellung der berechneten  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Werte für N-Acetyl-phytosphingosin (4d)



**Abbildung 63:** Darstellung der berechneten  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Werte der *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (4b)

## 5 Diskussion

Die Darstellung kosmetischer Wirkstoffe auf Grundlage der Sphingoidbase Phytosphingosin (**2**) ist erfolgreich durchgeführt worden. Das angewandte Syntheseverfahren könnte in größerem Maßstab auf Wirkstoffe wie Ceramide übertragen werden. Die Reinheit, Reinigung und Ausbeute für die Verbindungen liegen über den bislang für die Darstellung von *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) berichteten Daten [Meyers, 1997, US Patent]. Besonders die Abtrennung möglicher Verunreinigungen mittels präparativer Chromatographie führen zur wesentlichen Steigerung der Produktqualität. Diese hohe Reinheit der kosmetischen Wirkstoffe war eine Voraussetzung, um sie bei der Entwicklung neuartiger Methoden für die Wirkstoffprüfung einzusetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Keratinozyten und Hautmodellen die physiologischen und molekulargenetischen Eigenschaften von Wirkstoffen untersucht. Anhand dieser Testsysteme wurden *in vitro*-Screenings von Wirkstoffen möglich. Da es sich bei der Epidermis um ein sich ständig erneuerndes Gewebe mit einem hohen Ordnungsgrad handelt, stellt sich die Frage, wie der Organismus diese ausgewogene Balance zwischen Zellteilung und Differenzierung reguliert. Sich erneuerndes Gewebe behält die Fähigkeit, die Proliferationsrate im Fall von Verletzungen und Reparaturprozessen (Wundheilung) zu verändern.

Während der Differenzierung ändern Zellen ihre Morphologie und regulieren selektiv einzelne Marker. Entsprechende Differenzierungsmarker sind Involucrin, Loricrin, Filaggrin, Transglutaminase 1 und Keratin 10. Sie werden im Laufe des Differenzierungsprozesses induziert. Die epidermale Differenzierung im Endstadium ist entscheidend für den Aufbau der Barrierefunktion (Hornschicht).

## 5.1 Diskussion der Keratinozytenergebnisse

Damit eine Zellschädigung ausgeschlossen werden kann, wurden zur Untersuchung potentieller zytotoxischer Effekte Vorversuche an isolierten Keratinozyten menschlichen Ursprungs mit den Phytosphingosinderivaten durchgeführt. Als Vorversuche wurde die Bestimmung zytotoxischer Bewertungsparameter für jede der Testsubstanzen durchgeführt. Auf Grundlage der zytotoxischen Ergebnisse wurden die Einsatzkonzentrationen der Testsubstanzen für die DNA-Chipmethode gewählt. Es zeigte sich, dass für die Verbindungen *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) und *N*-Salicyoyl-phytosphingosin (**4a**) ab einer Konzentration von 25 µM zytotoxische Effekte auftraten. Dies wird auf das hohe Aktivitätspotential bzw. auf die biologische Aktivität zurückgeführt. Daher wurden für die Verbindungen **4a** und **4d** die Einsatzkonzentrationen für die über vier Tage laufende Applikationsversuche auf 5 µM herabgesetzt.

Damit auch die biologische Varianz menschlicher Keratinozyten berücksichtigt ist, wurde jede der Testsubstanzen an drei verschiedenen Zelllinien mikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse der einzelnen Zelllinien zeigten bei den morphologischen Bewertungen deutliche Unterschiede, besonders für die Zelllinie H 604. Hier verloren die Zellen teilweise den Kontakt zu den Nachbarzellen. Dies zeigt, dass Material humanen Ursprungs nicht als standardisiertes bzw. einheitliches Material betrachtet werden kann, wie es z. B. für Chemikalien gilt. Keratinozyten (primäre Epithelzellen) werden neben anderen Zelltypen (z. B. Fibroblasten, Melanozyten) oder auch humanen Keratinozytenzelllinien HaCaT-Zellen in *in vitro*-Testsystemen eingesetzt. Diese Testmethoden werden auch als 2D-Hautmodelle beschrieben [Mappes und Otten, 2004; Schäfer-Korting, 2004].

Im Anschluss an die morphologischen Untersuchungen erfolgte die Isolierung der total-RNA aus den Keratinozyten. Nach einer Applikationsdauer von 96 Stunden wurde für nahezu alle Substanzen eine geringere Menge an total-RNA als vor der Behandlung isoliert, wobei eine Differenzierung für einzelne Substanzen nicht möglich war. Für die daran anschließende DNA-Chipmethode wurde aus jeder der drei Zelllinien die gleiche definierte Menge an total-RNA entnommen, diese vereint und mittels der DNA-Chip Technologie untersucht.



## 5.2 Diskussion der DNA-Chip-Ergebnisse

Neuere Studien, in denen die Sphingolipidbasen mittels basaler humaner Keratinozyten im Vergleich zu Barriere-Ceramiden untersucht werden [Grether-Beck et al., 2005], beschreiben eindeutige Einflüsse der Sphingolipidbasen auf die Induktion der Differenzierungsmarker in den basalen Keratinozyten. In der Studie von Grether-Beck wird eine weitere Methodik angewendet, bei der Testsubstanzen auf die Keratinozyten appliziert werden. Die beschriebenen regulatorischen Effekte auf Grundlage verschiedener Marker werden mittels nachfolgender RT-PCR-Analytik erzielt [Farwick, 2005]. Ein wichtiges Ergebnis der Studie von Grether-Beck ist die Induzierung bestimmter ausgewählter Differenzierungsmarker nach Behandlung der Keratinozyten mit den Sphingolipidbasen.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Testsubstanzen zeigen als Ergebniss der DNA-Chip-Analysen hinsichtlich der Regulierung der Differenzierungsmarker Transglutaminase 1, Keratin 10, Involucrin, Filaggrin und Loricrin unterschiedliche regulatorische Effekte. Die Dauer der Applikation war eine entscheidende Einflussgröße für die Ausprägung regulatorischer Effekte der Marker. Die Studie von Grether-Beck [Grether-Beck et al., 2005] zeigt, dass für viele der untersuchten Differenzierungsmarker eine Veränderung der Aktivität erst nach 48 Stunden bzw. vielfach erst nach 72 Stunden Wirkstoffeinwirkung einsetzt. Es ist aber bekannt, dass bei der Induktion der Differenzierungsmarker Involucrin, Filaggrin und Loricrin eine konzertierte Regulation einsetzt, damit eine entsprechende Hornschicht ausgebildet wird [Grether-Beck et al., 2000 und 2003].

In dieser Arbeit wurde nach einer Applikationsdauer von 24 Stunden bzw. 96 Stunden insbesondere für die Verbindungen *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**), Phytosphingosin (**2**) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) die Induktion der Differenzierungsmarker beobachtet. Diese Gesamtergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen, die Grether-Beck et al. für Phytosphingosin und *N*-Hexanoyl-phytosphingosin beschreiben. Somit ergeben sich aus zwei unabhängigen Studien vergleichbare Resultate.

Für die in dieser Arbeit eingesetzte Vergleichssubstanz Retinol ist in der Literatur beschrieben, dass keine Übereinstimmung der Markerregulation zwischen Untersuchungen *in vivo* (kein Effekt) und *in vitro* (reprimiert) besteht [Fisher und Voorhees, 1996]. Wie zu erwarten war (Kapitel 4.6), zeigen die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit für die Vergleichssubstanz Retinol eine sehr starke Reprimierung der Differenzierungsmarker.

Nicht nur die Differenzierungsprozesse sind konzertierte Reaktionen, es werden neben den Prozessen der Differenzierung insbesondere vor dem Hintergrund der kosmetischen

Wirkstoffe besonders die Marker mitbetrachtet, die im Prozess der Hautalterung aktiv sind. Die Marker MMP 1 und Kollagen VII werden in der Literatur beschrieben, den kontrollierten Ab- und Umbau der Extrazellulären Matrix zu beeinflussen [Thibodeau, 2005]. Die MMPs spielen nicht nur bei der Hautalterung sondern auch bei der Wundheilung eine wichtige Rolle. Der Einfluss von verschiedenen Faktoren variiert bei den einzelnen MMPs und ist dabei abhängig vom jeweiligen Zellentyp und der Dosis der Substanz. Es wird beschrieben, dass MMPs in der Lage sind, die wesentlichen Komponenten der extrazellulären Matrix die Kollagene (z.B. Kollagen VII) abzubauen [Birkedal-Hansen, 1995].

In den DNA-Chip-Ergebnissen wurde kein ausgeprägtes Zusammenspiel der Marker MMP 1 und Kollagen VII beobachtet. Dies wurde unabhängig von der Applikationsdauer festgestellt. Abschließend weisen die Ergebnisse dieser Methode darauf hin, dass die Induzierung des Markers MMP 1 Eigenschaften der Keratinozyten aufzeigen, wie sie bei der Wundheilung auftreten.

Zusätzlich zu den Markern, die bei der Hautalterung involviert sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit Skalp als Stressmarker und Aquaporin 3 als Regulator des Wasserhaushaltes untersucht. In der Literatur sind Arbeiten zum Thema oxidativer Stress in Zusammenhang mit dem Marker Skalp beschrieben [Pfundt et al., 1996]. Retinol, in dieser Untersuchung als Kontrollsubstanz eingesetzt, wird vielfach als Antioxidans in der Dermatologie und Pharmazie beschrieben [Baltes, 2000]. Die Ergebnisse der DNA-Chipuntersuchung zeigten sowohl nach 24 als auch nach 96 Stunden eine Reprimierung des Markers Skalp durch Retinol. Nach 24 Stunden zeigten alle Testsubstanzen, außer *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4a**), für den Marker Skalp eine Induzierung. Dieses wurde in den Ergebnissen nach einer Applikationsdauer von 96-Stunden nicht bestätigt. Hier zeigt sich lediglich beim Phytosphingosin (**2**) eine Induzierung.

Der Marker Aquaporin 3 verhielt sich beim Retinol und bei den Testsubstanzen unauffällig. Lediglich nach 24 Stunden wurde dieser durch das *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) und das *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) induziert.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse der DNA-Chipanalyse für die jeweiligen Verbindungen deutliche Effekte. Das *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) zeigt nach einer Applikationsdauer von 24 Stunden eine Veränderung der Expressionen bei sechs von zehn untersuchten Markern. Das Phytosphingosin (**2**) und das *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) zeigten vergleichbare Tendenzen nach 96 Stunden, wobei auch hier sechs von zehn untersuchten Markern, besonders der Differenzierungsmarker, induziert werden. Die Effekte

durch die Verbindungen *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) und *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) sind nicht aussagekräftig und werden vernachlässigt.

## 5.3 Diskussion der Hautmodellergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Substanzen zusätzlich anhand von Hautmodellen, die aus Zellen in unterschiedlichem Differenzierungsstadium bestehen, über verschiedene Zeiträume untersucht. Auch in der Literatur wird berichtet, dass die Genexpression in Hautmodellen der in echter Haut nahe kommt [Deling, 2001]. Die in dieser Arbeit verwendeten Hautmodelle der Firma SkinEthic sind hinsichtlich unterschiedlicher Untersuchungen und Fragestellungen beschrieben. Es wurden Studien durchgeführt, die die Lipidzusammensetzung und Strukturen von kommerziell erhältlichen 3D-Modellen anhand von HPTLC-Bestimmungen vergleichen [Ponec et al., 2000]. Ponec bewertete die Eigenschaften kommerzieller Hautmodelle vor dem Hintergrund toxikologischer Reihenuntersuchungen, Penetrationsstudien und pharmazeutischer Risikobewertung (risk assessments) als eine gute Methode für die angewandte Forschung. Schmook et al. [2001] verglichen Penetrationseigenschaften von Menschen-, Ratten- und Schweinhaut mit kommerziell erhältlichen Hautäquivalenten, wobei die Autoren zu dem Ergebnis kommen, dass im Jahre 2001 angebotene Kunsthautmodelle nicht ohne Einschränkung für *in vitro*-Penetrationsstudien eingesetzt werden können [Riedel, 2003]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Testsubstanzen in ihrer typischen Applikationsform (Cremeformulierung) auf die Hautmodelle appliziert. Für die Methodvalidierung wurden Leerformulierungen (Formulierung ohne Wirkstoff) sowie Formulierungen mit Retinol (Vergleichssubstanz) verwendet.

Um sicherzustellen, dass die Hautmodelle über die Applikationszeiträume intakt waren, wurden Vitalitätsuntersuchungen nach Applikationszeiten von 24 und 72 Stunden bzw. nach 48 Stunden durchgeführt. Die Vitalität der Hautmodelle wurde anhand von zytotoxischen Untersuchungen (LDH und IL-8- Bestimmung) beurteilt. Zusätzlich wurde die isolierbare Menge an total-RNA aus den Hautmodellen ermittelt. Der Vergleich der Ergebnisse nach 48 Stunden aus den Kontrollstudien (Leerformulierungen) mit denen der Genexpressionen in der Haut (menschliche Haut-RNA) zeigten eine gute Übereinstimmung, lediglich für den Marker MMP 1 wurde diese nicht bestätigt. Auf Basis dieser Daten wurde für die

nachfolgenden Untersuchungen der Sphingolipidderivate eine Applikationsdauer auf den Hautmodellen von 48 Stunden festgelegt.

## 5.4 Diskussion der RT-PCR-Ergebnisse (Wirkstoffe)

Aufbauend auf den durchgeführten Voruntersuchungen wurden die Testsubstanzen für 48 Stunden auf die Hautmodelle aufgebracht und mittels der RT-PCR ausgewertet. Die Ergebnisse der total-RNA-Mengen für die Applikationszeit von 48 Stunden zeigten im Vergleich zu den Ergebnissen nach einer Applikationsdauer von 24 und 72 Stunden die geringste Schwankungsbreite. Im Gegensatz zu den Literaturdaten von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen mit Retinol, bei denen markante Expressionen beschrieben sind, wurden in dieser Untersuchung keine messbaren Expressionen festgestellt. Induzierende Effekte wurden im Bereich der Differenzierungsmarker für die Verbindungen Phytosphingosin (**2**) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) beobachtet. Im Bereich der Hautalterung zeigte sich eine Induzierung des Markers Kollagen VII unter Einwirkung des *N*-Hexanoyl-phytosphingosins (**4b**). Der Marker MMP 1 zeigte in der Untersuchung des *N*-Acetyl-phytosphingosins (**4d**) eine deutliche Reprimierung.

## 5.5 Abgleich der Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Prüfung der Einflüsse von Testsubstanzen auf Keratinozyten und Hautmodelle sind nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Die Methoden ergaben keine absoluten numerischen Werte bzw. Testergebnisse, jedoch bilden die Einflüsse auf die Regulation der Marker die gemeinsame Grundlage. Es zeigte sich anhand der isolierten total RNA-Menge (Keratinozyten, Hautmodell), dass die Applikationsdauer für alle applizierten Testsubstanzen bei beiden Methoden einen deutlichen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen die Resultate der zytotoxischen Tests (LDH-Freisetzung), da auch mit der Zunahme der Applikationsdauer die LDH-Freisetzung ansteigt.

Im Rahmen der Diskussion der DNA-Chipuntersuchungen auf Basis der Keratinozyten im Vergleich zu den Ergebnissen der RT-PCR-Methode auf Basis von Hautmodellen zeigte sich, dass für viele der untersuchten Marker eine höhere Expressionsveränderung bei der DNA-Chipuntersuchung gefunden wurde. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Keratinozyten direkt in Kontakt mit den Testsubstanzen kommen, wohingegen die Hautmodelle bewusst die natürliche Barrierefunktion der Epidermis nachbilden und somit die Penetrationseigenschaften der Testsubstanzen ein zu berücksichtigender Faktor sind. Aufgrund der Applikationsform lagen die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen bei den Hautmodellen höher als bei den Keratinozyten. Die Konzentration an Wirksubstanz hat einen Einfluss, der in dieser Arbeit nicht näher berücksichtigt werden konnte.

Am Beispiel von unterschiedlichen Acylceramiden und deren Extraktionsverhalten aus natürlicher und rekonstruierter Epidermis konnten Poncet et al. zeigen, dass die Derivate der Fettsäuremethylester vergleichbar zu den Acylceramiden isoliert werden [Poncet et al., 2003]. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit log- $P_{O/W}$ -Werte für die Testsubstanzen berechnet. Die Testsubstanzen mit höheren log- $P_{O/W}$ -Werten zeigten in den RT-PCR-Untersuchungen keine messbaren Expressionsveränderungen der Markergene. Dies wurde auch in den DNA-Chipanalysen beobachtet. Es bleibt die Frage offen, ob nur der hohe log- $P_{O/W}$ -Wert der Substanzen in Zusammenhang mit dem Ausbleiben einer Expressionsänderung gebracht werden kann. Weiterführende Untersuchungen wie z.B. Hautpenetrationen, könnten überprüfen in wie weit diese Substanzen die Barrierefunktion der Haut überwinden können.

Im direkten Vergleich der RT-PCR- und DNA-Chip-Ergebnisse zeigten die Verbindungen Phytosphingosin (**2**), *N*-Salicyloylphytosphingosin (**4a**) und *N*-Hexanoylphytosphingosin (**4b**) besonders bei den Differenzierungsmarkern Übereinstimmungen. Es bleibt aber zu berücksichtigen, dass aufgrund der Barrierefunktion bei den Hautmodellen die Expression moderater ausfällt als bei den DNA-Chipanalysen. Die Hautmodelle sind mehrschichtige Gewebeverbände mit Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Zellen können je nach Differenzierungsstadium unterschiedlich reagieren und somit abgeschwächte regulatorische Effekte zeigen [Neubert et al., 2001]. Zusammenfassend zeigte sich, dass die untersuchten 2D-(Keratinozyten) und 3D-(Haut)-Modelle in Zusammenhang mit den untersuchten Substanzen für die betrachteten Differenzierungsmarker gute Testsysteme darstellen. Hingegen ergab sich für den Marker MMP 1 ein inhomogenes Bild der veränderten Expressionen bei den 2D-(Keratinozyten)- und 3D-(Haut)-Modellen. Generell können die mit beiden Methoden erzielten Ergebnisse korreliert werden, wobei aber weitere wissenschaftliche Arbeiten im Bereich der Hautpenetration erforderlich sind.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Fragestellung, ob und welche regulatorischen Effekte und daraus resultierend welche Wirksamkeiten sich für verschiedene Derivate der Sphingoidbase Phytosphingosin beobachten lassen. Für die Wirksamkeitsbestimmung der eingesetzten Testsubstanzen wurden zwei unterschiedliche experimentelle Methoden gewählt, die DNA-Chiptechnologie (Zellkulturen) und die RT-PCR-Methode (Hautmodelle). Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Verwendung von Zellkulturen und Hautmodellen bestand in der Auftragung der zu untersuchenden Testsubstanzen. Wurden einerseits die gelösten Testsubstanzen direkt in das Kulturmedium der Keratinozyten gegeben, musste andererseits bei den Hautmodellen die Penetration der in Formulierung eingearbeiteten Testsubstanzen berücksichtigt werden. Die Aufnahme von Wirkstoffen in die Haut wird maßgeblich durch die Stoffeigenschaften und -konzentration, die Fläche der Applikation, deren Morphologie und Barrierefunktion sowie von den eingesetzten Formulierungen (Vehikeffekt) beeinflusst. In dieser Arbeit wurden die physiko-chemischen Parameter ( $\log P_{O/W}$ -Wert) der Testsysteme im Vorfeld theoretisch betrachtet und der Einfluss der Substanzen auf die physiologischen und molekulargenetischen Parameter in definierten 2D- bzw. 3D-Modellen untersucht. Die berechneten  $\log P_{O/W}$ -Wert korrelieren für die langkettige Verbindung *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) mit den RT-PCR-Ergebnissen. Vermutlich aufgrund des hohen  $\log P_{O/W}$ -Wert von 13 wurden keine messbaren Expressionsveränderungen der Markergene beobachtet. Somit ist davon auszugehen, dass die Verbindung nur bedingt in die Epidermis penetrieren wird.

### DNA-Chipmethode

Für die DNA-Chiptechnologie wurden aus menschlichem Gewebe Keratinozyten isoliert und diese in unterschiedlichen Altersstadien mit den gelösten Testsubstanzen in Kontakt gebracht. Um eine eventuelle Schädigung der Zellen zu minimieren, wurden vorab Zytotoxizitätsuntersuchungen der Keratinozyten durchgeführt und anhand dieser Daten die Konzentrationen der Testsubstanzen für den DNA-Chip festgelegt. Es wurde beobachtet, dass die Verbindungen *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) und das *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) bei erhöhter Konzentration im Vergleich zu ausgewählten Standards (SDS) Schädigungen der Zellen hervorrufen. Diese Effekte wurden bei den Verbindungen Phytosphingosin (**2**),

*N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) und *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) nicht beobachtet. Für die weiterführende DNA-Chipanalyse wurden die Konzentrationen der Testsubstanzen anhand dieser Daten ausgewählt. Die Keratinozyten wurden aufgearbeitet und die isolierte cDNA auf den DNA-Chip gegeben.

Die DNA-Chipanalyse zeigte für die jeweiligen Verbindungen deutliche Effekte, wobei besonders beim *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**), Phytosphingosin (**2**) und *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) eine Induzierung der Differenzierungsmarker beobachtet wurde.

Die Ergebnisse dieser Methode weisen außerdem darauf hin, dass die Induktion des Markers MMP 1 in den vorliegenden Keratinozyten Eigenschaften aufweisen, wie sie bei den Abläufen der Wundheilung auftreten.

Die für die Sphingolipidderivate durch die DNA-Chiptechnologie gefundenen Effekte wurden in komplexen physiologischen Modellen (Hautmodelle) überprüft. Die Untersuchungen berücksichtigen sowohl die topische Applikation der Wirkstoffe als auch die Barrierefunktion der Epidermis. Hierfür wurden die basalen Systemparameter analysiert und das Testsystem optimiert und validiert. Die Genexpression, die durch die Derivate in den Hautmodellen hervorgerufen wurde, wurde mittels RT-PCR ermittelt.

### **RT-PCR-Methode**

Die Validierung der RT-PCR-Methode erfolgte mittels Hautmodellen, auf denen Cremeformulierungen mit eingearbeiteten Testsubstanzen appliziert wurden. Nach unterschiedlichen Einwirkzeiten der Cremeformulierungen wurde die RNA isoliert und die isolierten RNA-Mengen der Hautmodelle mittels RT-PCR mit Standards verglichen. Es ergab sich für diese Testsubstanzen eine optimale Applikationszeit von 48 Stunden auf den Hautmodellen.

Eine Induzierung der Differenzierungsmarker für das *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) wurde analog zu den DNA-Chipergebnissen im Rahmen der Auswertung der RT-PCR-Daten gemessen. Im Bereich der Hautalterung wurde eine Induzierung des Kollagen VII durch das *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) beobachtet. Im Gegensatz zu den DNA-Chipdaten wurden keine Marker für die Wundheilung induziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wirkstoffeffekte der Sphingolipidderivate anhand der Genexpression im Keratinozytenmodell mittels DNA-Chip untersucht und durchaus durch die Genexpression in Hautmodellen mittels RT-PCR bestätigt wurden.

Es wurden in den DNA-Chip-Untersuchungen nach 24 Stunden Induzierungen der Marker Skalp (Stressmarker) und MMP 1 (Wundheilung) in den untersuchten Verbindungen bis auf *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**) beobachtet. Nach einem Behandlungszeitraum von 96 Stunden konnte dies Ergebnis nur noch abgeschwächt beobachtet werden. Keine Expressionsänderungen dieser Marker wurden in den RT-PCR-Untersuchungen bestimmt, lediglich eine Reprimierung von *N*-Acetyl-phytosphingosin (**4d**) wurde gesehen. Dieses Ergebnis, dass eine Expression in den Keratinozyten hervorruft und keine Änderung der Expression in den Hautmodellen, steht im Einklang mit der Aussage, dass Keratinozyten biochemisch als „offene Wunden“ beschrieben werden.

Die Verbindung *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**), die von allen untersuchten Derivaten den höchsten log  $P_{O/W}$ -Wert besitzt, zeigt in beiden Untersuchungen keine nennenswerten Expressionsveränderungen.

Nach einer 24-stündigen Behandlung der Keratinozyten mit *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**) wurde eine Genexpressionsänderung im Bereich der Differenzierungsmarker beobachtet, die nach 96 Stunden nicht mehr bestätigt wurde. Vergleichbar zu den 96 Stunden Ergebnissen der DNA-Chip-Untersuchungen wurden ebenfalls keine Expressionsänderung im Bereich der Differenzierungsmarker anhand von Hautmodellen mittels RT-PCR gesehen.

In den 96 Stunden DNA-Chip-Untersuchungen wurden bei den Verbindungen *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**) und Phytosphingosin (**2**) Genexpressionsänderung im Bereich der Differenzierungsmarker beobachtet. Übereinstimmend zu diesen DNA-Chip-Ergebnissen zeigten sich die Resultate im Bereich der Differenzierungsmarker für die Hautmodelluntersuchungen mittels RT-PCR.



## 7 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACTB	$\beta$ -Actin
AQP	Aquaporin
ARP	Actin-Related-Protein
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
COL	Kollagen
CT	Threshold cycle
Cytotox	Zytotoxikologische Untersuchung
D	Auswertung DNA-Chip Ergebnisse: Reprimiert
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribunucleinsäure
EA	Elementaranalyse
h	Stunde
I	Auswertung DNA-Chip Ergebnisse: Induziert
IL 8	Interleukin-8
INV	Involucrin
IR	Infrarotspektroskopie
KGM	Keratinocyte Growth medium
Kontrolle	Mit Lösungsmittel (Ethanol) behandelte Zellen
KRT	Keratin
LDH	Lactatdehydrogenase
Leerformulierung	Cremeformulierung ohne Wirkstoff
LOR	Loricrin
m/z	Ionenmasse/Ionenladung
M <sup>+</sup>	Molekülionenpeak
min.	Minute
MMP 1	Matrixmetalloproteinase 1
MS	Massenspektroskopie
N	Wellenzahl
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid

NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Hydroeen
NC	Auswertung DNA-Chip Ergebnisse: nicht verändert
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Primer	ein kurzes, in der PCR benötigtes Oligodesoxyribonukleotid
Profila	Profilaggrin
PS	Phytosphingosin
PS-C <sub>18</sub>	<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin
PS-C <sub>2</sub>	<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin
PS-C <sub>6</sub>	<i>N</i> -Hexanoyl Phytosphingosin
PS-SLC	<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
SLC	Salicylsäure
TEGIN M	Glycerinmonostearat
TEGO Alkanol 18	Stearylalkohol
TEGO Care 450	Polyglyceryl-3-methylglucose-distearat
TEGOSOFT liquid	Cetearyl-ethylhexanoat
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
TGM 1	Transglutaminase 1
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

## 8 Literatur

**Anne\_Rats**, [www.ratbehavior.org](http://www.ratbehavior.org), **2006**

**Baltes W.**, Lebensmittelchemie, Springer Verlag, 5. Auflage, Berlin Heidelberg New York, **2000**

**Beitz E., Schultz J. E.**, Aquaporine – zelluläre Wasserkanäle als therapeutisches Target, Pharm. i. u. Zeit 28, 67-73, **1999**

**Berardesca E., Barbaresch M., Veraldi S., Pimpinelli N.**, Evaluation of efficacy of a skin lipid mixture in patients with irritant contact dermatitis, allergic contact dermatitis or atopic dermatitis: a multicenter study, Contact Dermatitis 45, 280-285, **2001**

**Birkedal-Hansen H.**, Proteolytic remodeling of extracellular matrix, Current Opinion Cell Biol. 7, 728-735, **1995**

**Boddé H.E., van den Brink I., Koerten H.K., de Haan F. H. N.**, Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes, J. Contr. Rel. 15, 227-236, **1991**

**Bouwstra J. A., Dubbelaar F. E. R., Gooris G. S., Ponc M.**, The Lipids Organisation in the Skin Barrier, Acta. Derm. Venereol 208, 23-30, **2000**

**Bouwstra J. A., Gooris G. S., Dubbelaar F. E. R., Ponc M.**, Phase Behavior of *Stratum Corneum* Lipid Mixtures Based on Human Ceramides: The Role of Natural and Synthetic Cermides 1, The Society for Investigative Dermatology 4, 606-617, **2002**

**Bustin S. A.**, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, J. Mol. Endocrinol 29, 23-39, **2002**

**Bustin, S. A.**, Ablolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, J. Mol. Endocrinol. 25, 169-193, **2000**

- Candi E., Schmidt R., Melino G.,** The cornified envelope: a model of cell death in the skin, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 328-340, **2005**
- Cannon CL et al.,** New epidermal model for dermal irritancy testing, *Toxicol. in vitro* 8, 889-891, **1994**
- Chamlin S., Kao J., Frieden I. J.,** Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier functions provide a sensitive indicator of disease activity, *J. Am. Acad. Dermatol.* 47, 198-208, **2002**
- Chuaqui F., Bonner R. F., Best C. J. M., Gillespie J. W., Flaig M., J., Hewitt S. M., Phillips J. L., Krizman D. B., Tangrea M. A., Ahram M., Linehan W. M., Knezevic V., Emmert-Buck M. R.,** Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments, *Nature Genetics Supplement* 32, 509-514, **2002**
- Daylight,** [www.daylight.com](http://www.daylight.com), **2006**
- De Paepe K., Roseeuw D., Rogiers V.,** Repair of acetone- and sodium lauryl sulphate-damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids, *J. Eur. Acad. Dermatol Venereol (JEADV)* 16, 587-594, **2002**
- Deling L., Thomas G. T., Alyssa Schuck, Irwin M., Freedberg, Khitrov G., Blumenberg M.,** Rays and arrays: the transcriptional program in the response of human epidermal keratinocytes to UVB illumination, *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal* 15, 2533-2535, **2001**
- Didirjean L., Tran C., Sorg O., Saurat j. H.,** Biological activities of tropical natural retinaldehyde, *Dermatology* 199, suppl. 1, 19-24, **1999**
- Dietz T., Schick U., Korevaar K.,** Ceramide: natürlicher Schutz, der die Haut verjüngt, persönliche Mitteilung, *elements, Degussa Science Newsletter*, 05-08, **2002**
- Dreher F., Arens A., Hostynek J. J., Mudumba S., Ademola J., mMaibach H. I.,** Colorimetric method for quantifying human stratum corneum removes by adhesive-tape stripping, *Acta. Derm. Venereol.* 78 (3), 186-189, **1998**

- Dubar V., Gosset P., Aerts C., Voisin C., Wallaert B., Tonnel A. B.,** In vitro acute effects of tobacco smoke on tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by alveolar macrophages, *Exp. Lung. Res.* 19, 345-359, **1993**
- Effendy I., Löffler H., Happle R.,** Experiences testing with sodium lauryl sulphate as a tool predicting human skin susceptibility, 11<sup>th</sup>, International Symposium on Bioengineering and the Skin (ISBS), Zürich, **1996**
- Elias P. M.,** The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier, In: Osborne, D. W., Aman A.H. (Publ.), tropical drug delivery formulation, Marcel Dekker, Inc. New York und Basel, 13-28, **1990**
- Erllich H. A., Gelfand D., Sninsky J.J.,** Recent advances in the polymerase chain reaction, *Science* 252, 1643-1651, **1991**
- Eskild W., Hansson V.,** Vitamin A function in the reproductive organs, in: R. Blomhoff (Publ.): Vitamin A in health and disease, Dekker, New York, 531-559, **1994**
- EU Kommission,** EU Richtlinie 2003/15/EG zur Änderung der Richtlinie 76/768/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über kosmetische Mittel. O. J. der EU Kommission vom 11. März 2003, L66, 26-35, **2003**
- Falabella R.,** Suction blistering as a research and therapeutic tool in dermatology, *J. Int. Dermatol.* 39 (9), 670-671, **2000**
- Farwick M.,** Goldschmidt GmbH, Interne Studie nach OECD 428, **2005**
- Fisher G. J., Voorhees J. J.,** Molecular mechanisms of retinoid actions in skin, The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), *J.* 10, 1002-1013, **1996**
- Forslind B.,** A domain mosaic model of skin barrier, *Acta. Derm. Venerol.* 74, 72-77, **1999**
- Freeman W. M., Walker S. J., Vrana K. E.,** Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential, *Biotechniques* 26, 112-115, **1999**
- Fritsch P.,** Dermatologie, 3. Auflage, Springer Verlag New York Berlin Heidelberg, **1990**

- Fuchs E., Raghavan S.,** Getting under the skin of epidermal morphogenesis, Nature reviews, Genetic 3, 199-209, **2002**
- Gandarillas A., Goldsmith L. A., Gschmeissner S., Leigh I. M. and Watt F. M.,** Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes, Exp. Dermatol. 8, 1-9, **1999**
- Gazel A., Ramphal P., Rosdy M., De Wever B., Tornier C., Hosein N., Lee B., Tomic-Canic M., Blumenberg M.,** Transcriptional profiling of epidermal keratinocytes: Comparison of genes expressed in skin, cultured kertainocytes, and reconstituted epidermis, using large DNA Microarrays, J. Invest. Dermatol. 121 (6), 1459-1468, 2003
- Geilen C. C., Wieder T., Orfanos C. E.,** Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis, Arch. Dermatol. Res. 289, 599-566, **1997**
- Gombitza B.,** Lipidsysteme als Stratum corneum Modelle, Charakterisierung und Eignung für Permeationsuntersuchungen, Dissertation, TU-Braunschweig, **2001**
- Grether-Beck S., Bonizzi G., Felsner I., Timmer A., Schmitt-Brenden H., Sies H., Johnson J. P., Krutmann J.,** Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar ultraviolet A radiation, European Molecular Biology Organization (EMBO) 19, 5793-5800, **2000**
- Grether-Beck S., Felsner I., Brenden H., Krutmann J.,** Mitochondrial cytochrome C release mediates ceramides-induced activator protein 2 activation and genes expression in keratinocytes, J. Biol. Chem. 278, 47498-47507, **2003**
- Grether-Beck S., Krutmann J., Weitemeyer C., Farwick M., Lersch P.,** Barrier sphingoid bases and barrier ceramides induce differentiation in basal keratinocytes, International Federation of Societies Cosmetic Chemists (IFSCC) Kongress, **2005**
- Hedberg C. L., Wertz P. W., Downing D. T.,** The time course of lipid biosynthesis in pig epidermis. J. Invest. Dermatol. 91, 169-174, **1988**
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M.,** Real time quantitative PCR, Genome Res. 6, 986-994, **1996**

- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.,** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction, *Biotechnology (NY)* 11, 1026-1030, **1993**
- Holbrook K. A., Hennings H.,** Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review, *J. Invest. Dermatol.* 81, 11-24, **1983**
- Homalle A.,** Expériences physiologiques sur l'absorption par la tégument chez l'homme dans le main. *Union Med.* 7, 462-46, **1853**
- Hueber F., Wepierre J., Schaefer H.,** Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone, in vivo study in the hairless rat, *Skin Pharmacol.* 5 (2), 99-107, **1992**
- Hurks H. M., van der Molen R. G., Out-Luiting C., Vermeer B. J., Class F. H., Mommaas A. M.,** Differential effects of sunscreens on UVB-induced immunomodulation in humans, *J. Invest. Dermatol.* 109 (6), 699-703, **1997**
- In Vitro Biotec GmbH,** Seifen-Öle-Fette-Wachse (SÖFW) Journal 130, **2004**
- Invitrogen life technologies,** Vorschrift für SuperScript TM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, **2003**
- Ishidai-Yamamoto A., Kartasova T., Matsuo Sh., Kuroki T., Iizuka H.,** Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermis cell, *J. Invest. Dermatol.* 108, 12-16, **1997**
- Jansen T., Dissemond J., Grabbe S.,** Recent Understandings of the Development of Comedones (Comedogenesis) and Implications for Pathogenesis-Related Acne Therapy, *Akt. Dermatol.* 31, 440-447, **2005**
- Jimbow K.,** Development of targeted chemoradiotherapy for malignant melanoma by exploitation of metabolic pathway, *Hokkaido Igaku Zasshi* 73 (2), 105-110, **1998**
- Koizumi T.,** Kinetic analysis of drug disposition and biological response, *Yakugaku Zasshi* 120 (5), 445-454, **2000**
- Kucharekova M., Schalkwijk J., Van De Kerkhof P. C., Van de Valk P. G.,** Effect of a lipid-rich emollient, *Contact Dermatitis* 46, 331-338, **2002**

- Kussebin N.**, Universitätsklinikum Göttingen, Tagungsbeitrag Microarray Instrument für die Forschung, Onkologie, Hämatologie- Daten u. Informationen (ONKODIN), **2003**
- Lampe M. A., Burlingame A. L., Whitney J., Williams M. L., Brown B. E., Roitman E., Elias P. M.**, Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations, *J. Lipid. Res.* 24, 120-130, **1983**
- Landmann L.**, Die Permeabilitätsbarriere der Haut, *Pharm. i. u. Zeit* 4, 155-163, **1991**
- Lee C. H., Maibach H. I.**, The sodium lauryl sulfate model: An overview, *Contact Dermatitis* 33, 1-7, **1995**
- Lipshutz R. J., Fodor S. P. A., Gingeras T. R., Lockhart G., Lockhart D. J.**, High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nature Genetics* 21, 20-24, **1999**
- Loth H.**, Grundlagen des intra- und transdermalen Transportes von Arzneistoffen, I. *Acta. Pharm. Technol.* 32 (3), 109-114, **1986**
- Loth H.**, Grundlagen des intra- und transdermalen Transportes von Arzneistoffen, II. *Acta. Pharm. Technol.* 33 (1), 3-14, **1987**
- Mappes M., Otten S.**, Biochemische Prozesse in der Haut, *Seifen-Öle-Fette-Wachse (SÖFW) Journal* 130, 92-95, **2004**
- Menon G.K., Elias P.M.**, Morphologic basis for a pore-pathway in mammalian stratum corneum, *Skin Pharmacol.* 10, 235-246, **1997**
- Mimeault M., Bonnenfant D., Batra S. K.**, New advances on the function of epidermal growth factor receptor and ceramides in skin cell differentiation, disorders and cancers, Review, *Skin Pharmacol. Physiol.* 17, 153-166, **2004**
- Miyata Y., Okada K., Fujimoto A., Hata K., Kagami H., Tomita Y., Ueda M.**, The effect of the longterm cultivation on telomere length and morphology of cultured epidermis, *J. Dermatol. Sci.* 34 (3), 221-30, **2004**.
- Morrisson T.B., Weis J.J., Wittwer C.T.**, Quantification of low-copy transcript by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques* 24, 954-958, 960, 962, **1998**



- Motta S., Monti M., Sesana S., Caputo R., Carelli S., Ghidoni R.,** Ceramide composition of the psoriatic scale, *Biochim. Biophys. Acta.* 1182, 147-151, **1993**
- Motta S., Monti M., Sesana S., Melessi L., Ghidoni R., Caputo R.,** Abnormality of water barrier function in psoriasis, *Arch. Dermatol.* 130, 452-456, **1994**
- Mullis K. B., Faloona F. A.,** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.* 155, 366 **1986**
- Neubert R. H. H., Wohlrab W. A., Marsch W. Ch.,** Dermatopharmazie, Vehikel - Wirkstoffe - Pharmakologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2001**
- OECD Guidelines** for Testing of Chemicals, No. 117, OECD Paris **1992**
- Ogiso T., Iwaki M., Tanino T., Nishioka S., Higashi K., Kamo M.,** In vitro skin penetration and degradation of enkephalin, elcatonin and insulin, *Bio. Pharm. Bull.* 20 (1), 54-60, **1997**
- Paige D. G., Morese-Fisher N., Harper J. I.,** Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyosis, *Br. J. Dermatol.* 131, 23-27, **1994**
- Paus R., Menrad A., Czarnetzki B. M.,** Nekrobiologie der Haut: Apoptose. *Hautarzt* 46, 285-303, **1995**
- Pfundt R., Van Ruissen F., Van Vlijmen-Willems I. M. J. J., Alkemade A. C., Zeeuwen P. L. J. M., Jap P. H., Dijkman H., Fransen J., Croes H., Van Erp P. E. J., Schalkwijk J.,** Constitutive and Inducible Expression of SKALP / Elafin Provides Anti- Elastase Defense in Human Epithelia, *J. Clin. Invest.* 98, 1389-1399, **1996**
- Pilcher B. K., Dumin J. A., Sudbeck B. D.,** The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type 1 collagen matrix, *J. Cell. Biol.* 137 (69), 1445-1457, **1997**
- Pinkus H.,** Tape stripping in dermatological research, A review with emphasis on epidermal biology, *G. Ital. Dermatol.* 107 (5), 1115-1126, **1966**

- Pol A., Pfundt R., Zeeuwen P., Molhuizen H., Schalkwijk J.,** Transcriptional regulation of the elafin gene in human keratinozytes, *J. Int. Dermatol.* 120, 301-307, **2003**
- Polakowska R. R., Piacentitni M., Bartlett R., Goldsmith L. A., Haake A. R.,** Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm and stem cells, *Developmental Dynamics* 3, 176-188, **1994**
- Ponec M. et al.,** Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin, *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol.* 14, 63-71, **2001**
- Ponec M., Boelsma E., Weerheim A., Mulder A., Bouwstra J., Mommaas M.,** Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models, *J. Int. Pharm.* 203, 211-225, **2000**
- Ponec M., Weerheim A., Lankhorst P., Wertz P.,** New Acylceramide in Native and Reconstructed Epidermis, *J. Invest. Dermatol.* 120, 581-588, **2003**
- Riedel S.,** Vergleichende Untersuchungen zur dermalen Penetration und Permeation in Diffusionszellen, Dissertation Hannover, **2003**
- Rieger M.,** Ceramides: Their promise in skin care, *Cosmetics and Toiletries*, **1996**
- Rieger M., Dietl J., Kämmerer U., Sütterlin U.,** HLA-G positive/negative Chorionkarzinomzellen modulieren die Zytokinproduktion der CD56++ dezidualen Lymphozyten, *J. Fertilität Reproduktion* 11 (3), 27-31, **2001**
- Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T.,** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* 245, 154-160, **1997**
- Sallenave J. M.,** The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase specific inhibitor/skin derived antileukoproteinase) as alarm proteinases in inflammatory lung disease, *Resp. Res.* 1, 87-92, **2000**
- Sambrook J. and Russel D. W.,** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> Edition., Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2001**
- Schäfer-Korting M.,** Vortrag und persönliche Mitteilung, Symposium Gesellschaft für Dermopharmazie, Berlin, November **2004**

- Schaffer M. R., Tantry U., Ahrendt G. M., et al.**, Stimulation of fibroblast proliferation and matrix contraction by wound fluid, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1), 231-239, **1997**
- Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H.A.**, Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomics sequences, *Science* 5, 233 (4768), 1076-1080, **1986**
- Scheuplein R. J.**, Properties of the skin as a membrane, *Adv. Biol. Skin.* 12, 125-152, **1972**
- Schmook F. P., Meingassner J. G., Billich A.**, Comparison of human skin or epidermal models with human and animal skin in-vitro percutaneous absorption, *J. Int. Pharm.* 215, 54-56, **2001**
- Schulze A., Downward J.**, Navigating gene expression using microarrays - a technology review, *Nature Cell Biology* 3, 190-195, **2001**
- Skinethic Homepage**, [www.skinethics.com](http://www.skinethics.com), **2005**
- Smith W. P., Christensen M. S., Nacht S., Gans E. H.**, Effect of lipids on the aggregation and permeability of human stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 78, 7-11, **1982**
- Spielmann H.**, Alternative Testmethoden ohne Tierversuche: Möglichkeiten und Grenzen in der regulatorischen Toxikologie, 45. Frühjahrstagung der Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie (DGPT), Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) im BfR, **2004**
- Spielmann H., Liebsch M., Döring B., Moldenhauer, F.**, Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch, *Altex* (1), **1994**
- Steinert P. M., Marek L. N.**, The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin and small poline-rich protein 1 and 2 are isopeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope, *J. Biol. Chem.* 270 (30), 17702-17711, **1995**
- Stoss A.**, Die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Ceramid-induzierten Apoptose in der humanen Keratinozyten Zelllinie HaCaT, Dissertation Berlin, **1999**

**Syrres**, [www.syrres.com](http://www.syrres.com), **2006**

**Tanaka N., Fujioka A., Tajima S., Ishibashi A., Hirose S.**, Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  simulate its secretion in vitro, *Br. J. Dermatol.* 143, 728-732, **2000**

**Tasanen K., Tunggal L., Chometon G., Bruckner-Tuderman L., Aumailley M.**, Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. *Am. J. Pathol.* 164 (6), 2027-2038, **2004**

**Thellin O., Zorzi B., Lakaye B., De B.B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E.**, Housekeeping genes as internal standards: use and limits, *J. Biotechnol.* 75, 291-295, **1999**

**Thibodeau A.**, The Crucial Role of Metalloproteinase Inhibitors and Regenerating Antioxidants in the Age-Related Alterations of the Skin, *Seifen-Öle-Fette-Wachse (SÖFW) Journal* 131, 10-20, **2005**

**Thudichum J. L. W.**, Researches on the chemical constitution of the brain, Report of the Medical Officer of Privy Council and Local Government Board, New series no III, 113, **1874**

**ToxiLight™**, non-destructive cytotoxicity assay, Cambrex Bio Science Rockland

**Trengove N. J., Stacey M. C., MacAuley S.**, Analysis of acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors, *Wound Repair Regen* 7 (6), 442-452, **1999**

**Ullmann R.**, Stellungnahme der Enquete-Kommission, Deutscher Bundestag, Kom.-Drs. 15/246, Berlin **2005**

**Umbach W.**, Kosmetik und Hygiene von Kopf bis Fuß, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA Weinheim, **2004**

**Vannahme C.**, Isolierung und Charakterisierung neuer extrazellulärer Calcium-bindender Proteine der BM-40 Familie, Dissertation Köln, **2000**

- ViaLight™ Plus**, High sensitivity cell proliferation/cytotoxicity kit with extended signal stability, Cambrex Bio Science Rockland
- Watt F. M., Phil D.**, Involucrin and other markers of keratinocytes differentiation, *J. Invest. Dermatol.* 81, 100-103, **1983**
- Wertz P. W., Downing D. T.**, Covalently bound  $\omega$ -hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum, *Biochem. Biophys. Acta* 917, 108-111, **1987**
- Wertz P. W., Downing D. T.**, Glycolipids in mammalian epidermis: Structure and function in the water barrier, *Science* 217 (4566), 1261-1262, **1982**
- Wertz P. W., Madison K.C., Downing D. T.**, Covalently bound lipids of human stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 92, 109-111, **1989a**
- Wertz P. W., Swartzendruber D. C., Kitko D. J.**, The role of the corneocyte envelope in cohesion of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* 93, 169-172, **1989b**
- Wertz P. W.**, The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects, *Adv. Drug Delivery Rev.* 18, 283-294, **1996**
- Wiedow O., Schröder J. M., Gregory H., Young J. A., Christophers E.**, Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin, Purification, characterization and complete amino acid sequence, *J. Biol. Chem.* 265, 14791-14795, **1990**
- Zellmer S., Reissig D., Lasch J.**, Reconstructed human skin as model for liposome-skin interaction, *J. Contr. Rel.* 55 (2-3), 271-279, **1998**

## 9 Anhang

### 9.1 Zytotoxische Ergebnisse

Aus organisatorischen Gründen werden die zytotoxischen Bestimmungen an zwei unterschiedlichen Tagen, jedoch mit der gleichen Zelllinie H 608 durchgeführt (siehe Kapitel 4.3).

#### 9.1.1 Einzelergebnisse der LDH Freisetzung des ersten Ansatzes Keratinozyt Typ 1

**Tabelle 1:** Substanzen Keratinozyt Typ 1

Keratinozyt Typ 1
Retinol
SDS
Phytosphingosin (2)
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin (4a)
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin (4c)

In den folgenden Tabellen wird mit der Angabe 100 % Aktivität im Überstand eine Aussage über den Prozentanteil an avitalen Zellen angegeben (100 % Aktivität im Überstand = 100 % avitale Zellen).

#### Aktivitätsmessung im Überstand

**Tabelle 2:** Aktivitätsmessung am Tag 0 im Überstand

Probe	% Aktivität im Überstand	Probe	% Aktivität im Überstand
Well 1	6,88	Well 7	4,63
Well 2	11,88	Well 8	8,45
Well 3	8,58	Well 9	7,74
Well 4	15,36	Well 10	9,14
Well 5	7,15	Well 11	10,30
Well 6	8,18	Well 12	7,85
% Aktivität im Überstand am Tag 0: $\bar{x}$ = 8,84			
Standardabweichung: $\pm$ 2,72			

### Aktivitätsmessung im Überstand (Kapitel 4.3, Abbildung 20)

**Tabelle 3:** Aktivitätsmessung am ersten Tag im Überstand

Probe	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	% Aktivität im Überstand	$\Delta$ Aktivität zur Kontrolle
Kontrolle	0	12,68	3,83
	0	14,02	5,18
Phytosphingosin (2)	1	14,68	5,84
	5	15,36	6,52
	25	17,38	8,54
<i>N</i> -Salicyloyl- phytosphingosin (4a)	1	16,83	7,99
	1	17,02	8,18
	5	10,77	1,92
	5	14,72	5,88
	25	9,80	0,96
	25	11,88	3,03
<i>N</i> -Stearoyl- phytosphingosin (4c)	1	13,62	4,77
	5	13,33	4,49
	25	11,23	2,38
SDS	25	18,08	9,24
	50	26,12	17,27
	250	95,63	86,79
Retinol	1	10,72	1,88
	5	13,72	4,88
	25	17,65	8,80

**Aktivitätsmessung im Überstand (Kapitel 4.3, Abbildung 22)****Tabelle 4:** Aktivitätsmessung am vierten Tag im Überstand

Probe	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	% Aktivität im Überstand	$\Delta$ Aktivität zur Kontrolle
Kontrolle	0	24,35	15,51
	0	25,60	16,76
Phytosphingosin (2)	1	30,24	21,39
	5	24,87	16,03
	25	27,64	18,79
N-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	1	29,57	20,72
	1	28,65	19,80
	5	25,46	16,62
	5	27,36	18,52
	25	72,67	63,83
	25	74,51	65,67
N-Stearoyl-phytosphingosin (4c)	1	25,24	16,40
	5	28,25	19,41
	25	30,62	21,78
SDS	25	60,16	51,32
	50	92,49	86,65
	250	17,86 Enzym zersetzt	9,01
Retinol	1	22,77	13,93
	5	26,29	17,45
	25	25,38	16,54



## 9.1.2 Einzelergebnisse der LDH Freisetzung des zweiten Ansatzes Keratinozyt Typ 2

**Tabelle 5:** Substanzen Keratinozyt Typ 2

<b>Keratinozyt Typ 2</b>
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin ( <b>4d</b> )
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin ( <b>4b</b> )
SDS
Retinol

### Aktivitätsmessung im Überstand

**Tabelle 6:** Aktivitätsmessung am Tag 0 im Überstand

<b>Probe</b>	<b>% Aktivität im Überstand</b>	<b>Probe</b>	<b>% Aktivität im Überstand</b>
Well 1 Tag 0	5,57	Well 5	3,81
Well 2 Tag 0	5,33	Well 8	3,30
Well 3 Tag 0	3,93	Well 7	10,09
Well 4 Tag 0	4,22	Well 8	12,26
% Aktivität im Überstand am Tag 0: $\bar{x}$ = 6,06			
Standardabweichung: +/- 3,30			

**Aktivitätsmessung im Überstand (Kapitel 4.3, Abbildung 21)****Tabelle 7:** Aktivitätsmessung am Tag 1 im Überstand

Probe	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	% Aktivität im Überstand	$\Delta$ Aktivität zur Kontrolle
Kontrolle	0	7,83	1,77
	0	6,03	-0,03
	0	3,89	-2,18
SDS	1	4,12	-1,95
	5	4,51	-1,55
	25	8,96	2,90
	125	77,69	71,63
	250	26,38 Enzym zersetzt	20,32
	1000	11,24 Enzym zersetzt	5,18
Retinol	1	2,82	-3,25
	5	4,21	-1,85
	25	6,80	0,74
<i>N</i> -Acetyl- phytosphingosin (4d)	1	3,54	-2,52
	5	3,74	-2,32
	25	5,71	-0,36
<i>N</i> -Hexanoyl- phytosphingosin (4b)	1	5,30	-0,76
	5	2,49	-3,58
	25	3,29	-2,77

### Aktivitätsmessung im Überstand (Kapitel 4.3, Abbildung 23)

**Tabelle 8:** Aktivitätsmessung am Tag 4 im Überstand

Probe	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	% Aktivität im Überstand	$\Delta$ Aktivität zur Kontrolle
Kontrolle	0	-1,39	-2,25
	0	-3,50	-4,36
	0	-2,45	-3,32
SDS	1	-3,86	-4,29
	5	-3,53	-4,51
	25	16,74	14,21
	125	59,80	-4,72
	250	-0,75 Enzym zersetzt	2,84
	1000	29,19 Enzym zersetzt	49,87
Retinol	1	-3,89	-4,76
	5	-3,37	-4,23
	25	-2,96	-3,83
<i>N</i> -Acetyl- phytosphingosin (4d)	1	-3,69	-4,56
	5	-3,51	-4,37
	25	33,71	32,85
<i>N</i> -Hexanoyl- phytosphingosin (4b)	1	-4,01	-4,87
	5	-2,07	-2,94
	25	-0,06	-0,92

### 9.1.3 Zytotoxische Auswertung der Testmethode mit ViaLight™ Plus

**Tabelle 9:** ATP-Freisetzung am ersten Tag (Kapitel 4.3, Abbildung 24 und 25)

Testsubstanzen		Konzentrationen		
	Kontrolle [0 µM]	25 µM	50 µM	250 µM
SDS	100	75	48	0
	Kontrolle [0 µM]	25 µM	125 µM	250 µM
SDS	100	99	5	4
	Kontrolle [0 µM]	1 µM	5 µM	25 µM
Retinol	100	92	108	84
Retinol	100	107	107	104
Phytosphingosin (2)	100	96	90	96
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	100	101	89	88
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin (4b)	100	96	97	100
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin (4c)	100	101	82	92
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin (4d)	100	104	91	104

**Tabelle 10:** ATP-Freisetzung am vierten Tag (Kapitel 4.3, Abbildung 26 und 27)

Testsubstanzen		Konzentrationen		
	Kontrolle [0 µM]	25 µM	50 µM	250 µM
SDS	100	20	0	0
	Kontrolle [0 µM]	25 µM	125 µM	250 µM
SDS	100	70	4	3
	Kontrolle [0 µM]	1 µM	5 µM	25 µM
Retinol	100	83	89	104
Retinol	100	89	95	89
Phytosphingosin (2)	100	90	102	96
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	100	86	81	9
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin (4b)	100	96	97	104
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin (4c)	100	80	80	75
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin (4d)	100	97	103	46

### 9.1.4 Zytotoxische Auswertung der Testmethode mit ToxiLight™

**Tabelle 11:** Freisetzung des Enzyms Adenylat Kinase am ersten Tag (Kapitel 4.3, Abbildung 28 und 29)

Testsubstanzen	Kontrolle [0 µM]	25 µM	50 µM	250 µM
SDS	100	175,00	210,00	130,00
	Kontrolle [0 µM]	25 µM	125 µM	250 µM
SDS	100	75,00	375,00	250,00
	Kontrolle [0 µM]	1 nM	5 nM	25 nM
Retinol	100	90	130	180
Retinol	100	99	75	75
Phytosphingosin (2)	100	120	110	130
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	100	150	80	80
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin (4b)	100	110	80	120
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin (4c)	100	135	140	130
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin (4d)	100	90	135	130

**Tabelle 12:** Freisetzung des Enzyms Adenylate Kinase am vierten Tag (Kapitel 4.3, Abbildung 30 und 31)

Testsubstanzen	Kontrolle [0 µM]	25 µM	50 µM	250 µM
SDS	100	110	50	25
	Kontrolle [0 µM]	25 µM	125 µM	250 µM
SDS	100	400	70	40
	Kontrolle [0 µM]	1 µM	5 µM	25 µM
Retinol	100	20	90	115
Retinol	100	140	300	140
Phytosphingosin (2)	100	110	80	115
<i>N</i> -Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	100	90	80	140
<i>N</i> -Hexanoyl-phytosphingosin (4b)	100	95	100	180
<i>N</i> -Stearoyl-phytosphingosin (4c)	100	130	130	140
<i>N</i> -Acetyl-phytosphingosin (4d)	100	80	95	630

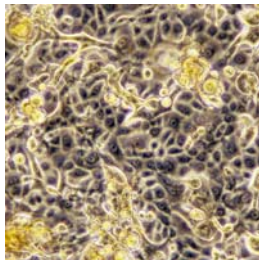
## 9.2 Mikroskopische Ergebnisse (Kapitel 5.4)

### Vergrößerung der mikroskopischen Aufnahmen

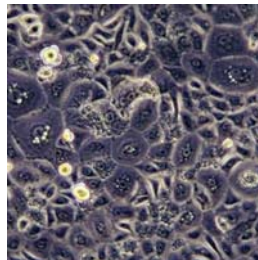
Objektiv	20x
Phototubus	10x
Tubusfaktor	1x
Kleinbildkamera	0,32x

Somit ergibt sich eine 64 fache Vergrößerung. Ein Dia von (24 x 36 mm) lichtet somit eine Fläche von 375 µm x 562 µm ab.

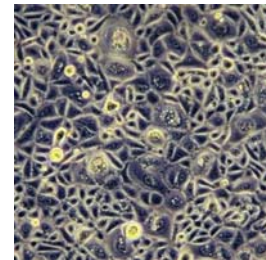
### 9.2.1 Mikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten am ersten Tag



**H 604**

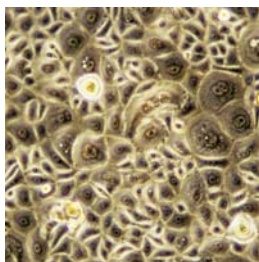


**H 614**

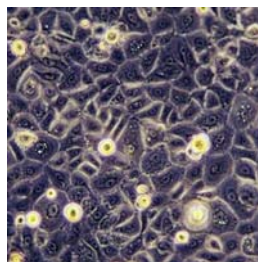


**H 625**

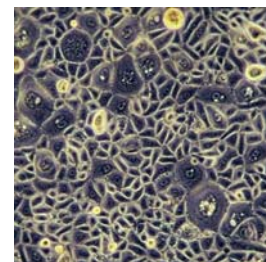
**Abbildung 1:** Mikroskopische Aufnahmen von den Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 1



**H 604**

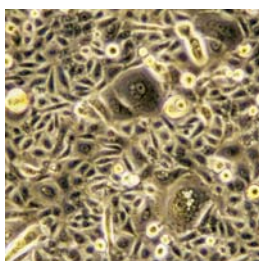


**H 614**

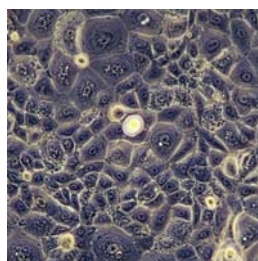


**H 625**

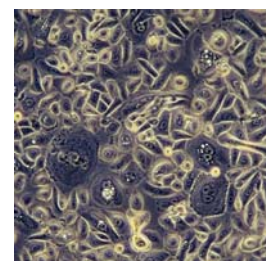
**Abbildung 2:** Mikroskopische Aufnahmen von den Keratinozyten nach Behandlung mit der Kontrolle 2



**H 604**

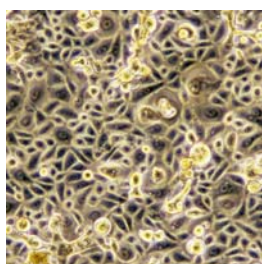
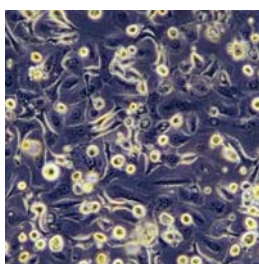
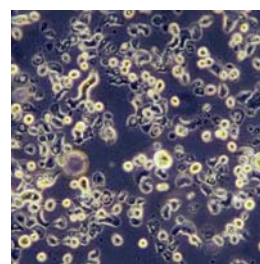


**H 614**

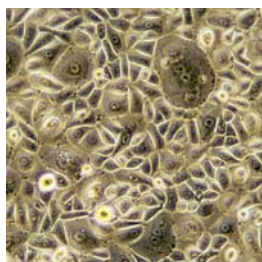
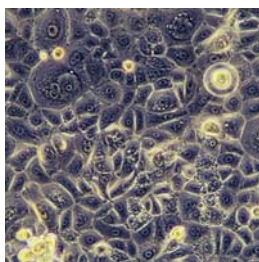
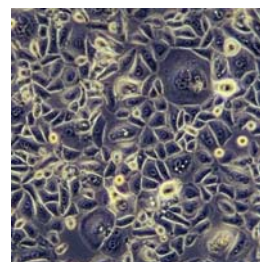


**H 625**

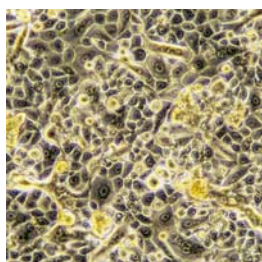
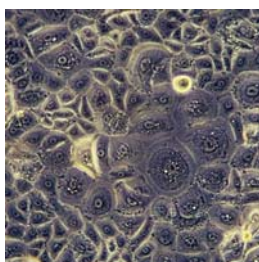
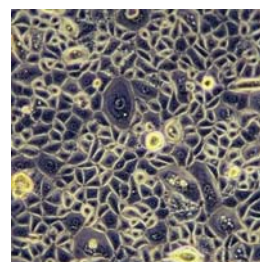
**Abbildung 3:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 25 µM Phytosphingosin (2)

**H 604****H 614****H 625**

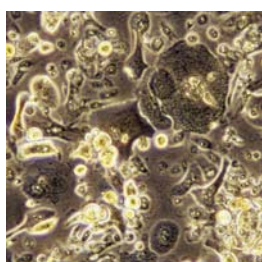
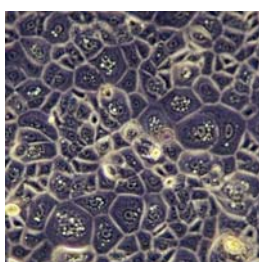
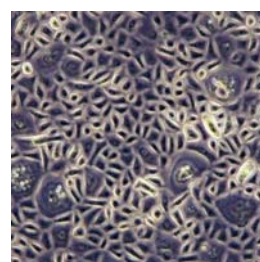
**Abbildung 4:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 25  $\mu$ M *N*-Acetyl-phytosphingosin (4d)

**H 604****H 614****H 625**

**Abbildung 5:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 25  $\mu$ M *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (4b)

**H 604****H 614****H 625**

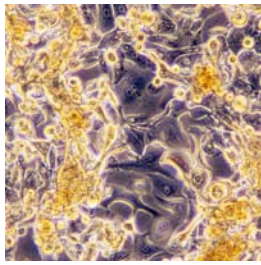
**Abbildung 6:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 25  $\mu$ M *N*-Stearoyl-phytosphingosin (4c)

**H 604****H 614****H 625**

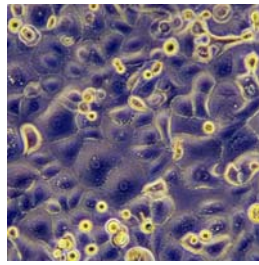
**Abbildung 7:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 25  $\mu$ M *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)



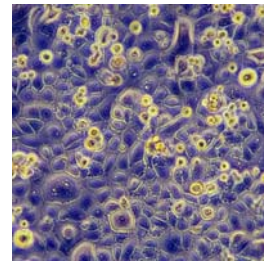
## 9.2.2 Mikroskopische Aufnahmen am vierten Tag



**H 604**

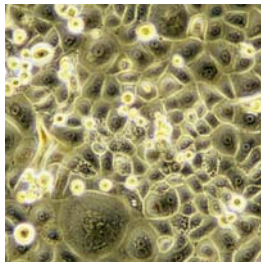


**H 614**

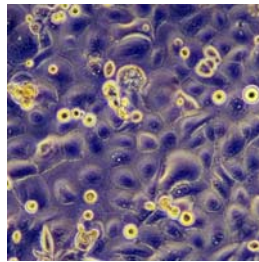


**H 625**

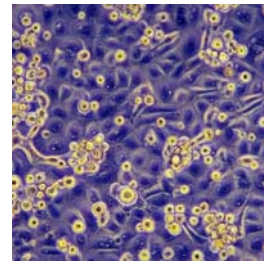
**Abbildung 8:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit der Kontrolle 1



**H 604**

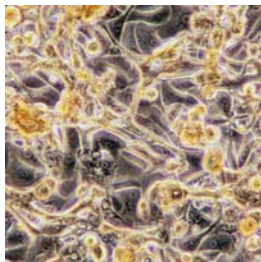


**H 614**

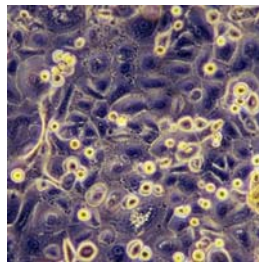


**H 625**

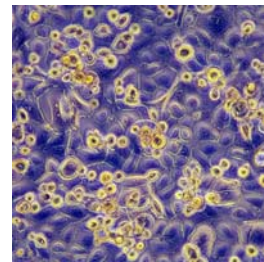
**Abbildung 9:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit der Kontrolle 2



**H 604**

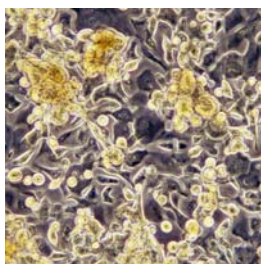


**H 614**

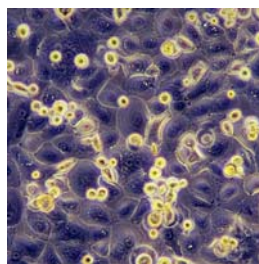


**H 625**

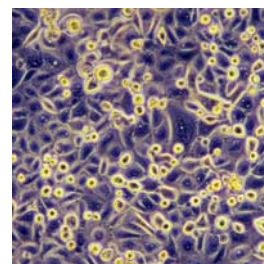
**Abbildung 10:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 25 µM Phytosphingosin (2)



**H 604**



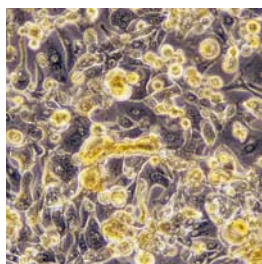
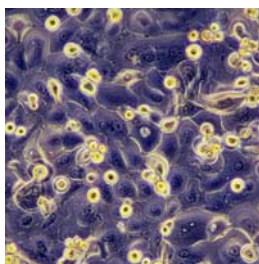
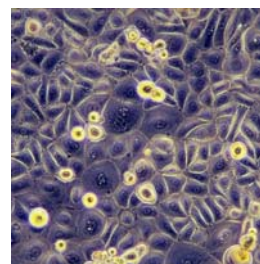
**H 614**



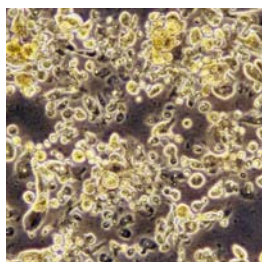
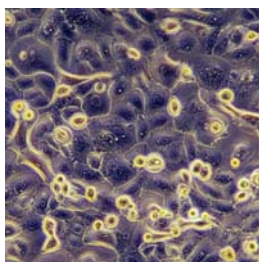
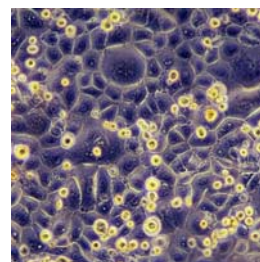
**H 625**

**Abbildung 11:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 5 µM *N*-Acetyl-phytosphingosin (4d)

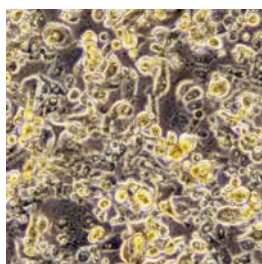
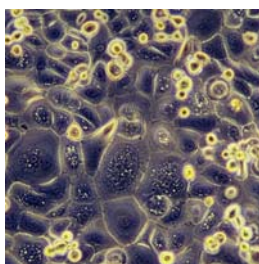
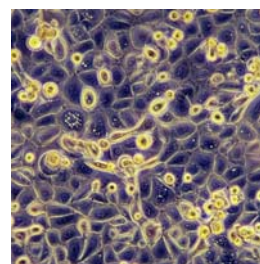


**H 604****H 614****H 625**

**Abbildung 12:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 25  $\mu$ M *N*-Hexanoyl-phytosphingosin (**4b**)

**H 604****H 614****H 625**

**Abbildung 13:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 25  $\mu$ M *N*-Stearoyl-phytosphingosin (**4c**)

**H 604****H 614****H 625**

**Abbildung 14:** Mikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Keratinozyten mit 5  $\mu$ M *N*-Salicyloyl-phytosphingosin (**4a**)

## 9.3 Ergebnisse der DNA-Chipanalyse Tag 1 und Tag 4

**Tabelle 13:** Veränderung der Expression durch die Testsubstanzen nach einem Tag [Kontrolle 1/ Kontrolle 2] (Kapitel 4.6, Tabelle 15)

Substanzen	Trans.	KRT 10	KRT 5	Filaggrin.	Loricrin	Skalp	Aquap. 3	MMP 1	Involucrin	Kollagen VII
PS (2)	1,62/1,41	-1,07/1,00	-1,15/1,07	1,32/1,07	1,87/1,23	1,23/1,32	1,23/1,15	1,74/1,23	1,23/1,23	1,00/-1,07
PS-SLC(4a)	3,03/2,46	-1,52/-1,41	-1,32/-1,07	-1,23/-1,41	-2,00/-2,46	1,23/1,32	1,32/1,23	7,46/5,28	1,07/1,07	-1,07/1,07
PS-C6 (4b)	1,62/1,41	-1,07/1,00	-1,07/1,07	2,84/2,30	4,00/3,25	1,32/1,52	1,15/1,15	4,59/3,48	1,23/1,23	-1,15/-1,07
PS-C18 (4c)	-1,23/-1,32	-1,07/1,00	-1,07/1,07	1,07/-1,55	1,00/-1,32	-1,07/1,00	1,15/1,07	-1,14/-1,62	1,00/1,00	-1,41/-,32/
PS-C2 (4d)	2,14/1,74	1,07/1,15	1,00/1,15	-1,07/-1,32	1,15/-1,07	1,32/1,41	1,51/1,41	9,84/7,46	1,15/1,07	-1,15/-1,15

**Tabelle 14:** Veränderung der Expression nach einem Tag (Kontrolle 1 und 2)

Substanzen	Trans.	KRT 10	KRT 5	Filaggrin.	Loricrin	Skalp	Aquap. 3	MMP 1	Involucrin	Kollagen VII
Kontrolle 1	412,1	5820,7	3252,4	647,8	326,8	1859,6	2442,1	347,3	3527,4	429,3
Kontrolle 2	431,4	5140,7	3211	762,8	401,7	1737	2584,9	502,0	3587,8	393,2
Retinol	-1,51/-1,86	-1,07/1,07	-3,48/-3,24	-2,30/-3,03	-1,51/-1,41	-4,92/-6,08	1,07/1,07	2,30/1,74	1,00/1,00	-1,23/-1,15

**Tabelle 15:** Veränderung der Expression durch die Testsubstanzen nach vier Tagen [Kontrolle 1/ Kontrolle 2] (Kapitel 4.6, Tabelle 16)

Substanzen	Trans.	KRT 10	KRT 5	Filaggrin.	Loricrin	Skalp	Aquap. 3	MMP 1	Involucrin	Kollagen VII
PS (2)	1,2/1,5	1,1/-1,2	1,7/1,3	1,1/1,0	1,4/1,2	1,32/1,41	1,15/1,15	1,23/3,73	1,52/1,32	1,07/1,00
PS-SLC(4a)	1,6/2,1	1,2/-1,1	1,3/1,0	1,4/1,4	1,7/1,6	1,23/1,32	1,32/1,32	1,41/5,27	1,32/1,07	-1,23/-1,52
PS-C6 (4b)	1,2/1,4	1,3/-1,1	1,3/1,0	1,1/-1,1	1,0/-1,1	1,15/1,23	1,15/1,15	1,51/5,27	1,23/1,07	1,23/1,00
PS-C18 (4c)	-1,1/-1,1	1,1/-1,3	1,1/-1,1	-1,1/-1,1	1,1/1,0	-1,07/1,00	-1,07/-1,07	-2,46/1,41	1,07/-1,07	1,00/-1,23
PS-C2 (4d)	1,1/1,3	1,4/1,0	1,3/1,1	1,1/1,0	1,3/1,2	1,15/1,15	1,15/1,15	-1,07/3,24	1,23/1,07	1,15/-1,07

**Tabelle 16:** Veränderung der Expression nach vier Tagen (Kontrolle 1 und 4)

Substanzen	Trans.	KRT 10	KRT 5	Filaggrin.	Loricrin	Skalp	Aquap. 3	MMP 1	Involucrin	Kollagen VII
Kontrolle 1	1336,0	3781,0	5809,4	3183,2	3152,9	4450,3	2725,7	1256,9	5569,0	255,4
Kontrolle 2	844,8	5044,6	7263,1	3359,9	3506,3	4269,7	2751,4	1056,1	6657,7	282,4
Retinol	-4,6/-3,7	-2,3/-3,2	1,1/-1,2	-9,8/-9,8	-36,8/-34,3	-2,82/-2,30	1,00/1,00	-1,14/3,03	-1,32/-1,52	1,23/1,07

## 9.4 Auswertung der Hautmodell Ergebnisse

### 9.4.1 Isolierte total-RNA-Mengen der Hautmodelle (Skinethic) nach 24 und 72 Stunden (Leerformulierungen)

Angaben zu den Versuchen sind in Kapitel 4.7.2 beschrieben. Die Angaben der total-RNA-Mengen sind angegeben in  $\mu\text{g}/\text{Hautmodell}$  ( $0,5 \text{ cm}^2$ ).

**Tabelle 17:** Isolierte total-RNA-Mengen der Hautmodelle

<b>Probenbezeichnung (24h)</b>	<b>total-RNA</b>
Leerformulierung	13,1
Leerformulierung	11,7
Leerformulierung	13,7
<b><i>Mittelwert total-RNA</i></b>	<b><i>12,8</i></b>
<b>Probenbezeichnung (72h)</b>	<b>total-RNA</b>
Leerformulierung	2,1
Leerformulierung	3,9
Leerformulierung	1,2
<b><i>Mittelwert total-RNA</i></b>	<b><i>2,4</i></b>

### 9.4.2 Isolierte total-RNA-Mengen der Hautmodelle nach 24 und 72 Stunden (Vergleichssubstanz: Retinol)

**Tabelle 18:** Isolierte total-RNA-Mengen der Hautmodelle

<b>Probenbezeichnung (24h)</b>	<b>total-RNA</b>
Retinol	10,8
Retinol	9,0
Retinol	11,5
<b><i>Mittelwert total-RNA</i></b>	<b><i>10,4</i></b>
<b>Probenbezeichnung (72h)</b>	<b>total-RNA</b>
Retinol	4,4
Retinol	4,7
Retinol	6,4
<b><i>Mittelwert total-RNA</i></b>	<b><i>5,2</i></b>

### 9.4.3 Isolierte total-RNA-Mengen der Hautmodelle nach 48 Stunden (Leerformulierungen)

**Tabelle 19:** Isolierte total-RNA-Mengen der Hautmodelle

<b>Probenbezeichnung (48h)</b>	<b>total-RNA</b>
Leerformulierung 1	5,9
Leerformulierung 1	6,1
Leerformulierung 1	5,1
<b><i>Mittelwert total-RNA</i></b>	<b><i>5,7</i></b>
Leerformulierung 2	7,3
Leerformulierung 2	7,7
Leerformulierung 2	7,4
<b><i>Mittelwert total-RNA</i></b>	<b><i>7,5</i></b>

### 9.4.4 Isolierte total-RNA-Mengen der Hautmodelle (Testsubstanzen)

**Tabelle 20:** Isolierte total-RNA-Mengen der Hautmodelle

Probenbezeichnung (48h)	total-RNA
Retinol	6,5
Retinol	5,9
Retinol	8,2
<b>Mittelwert total-RNA</b>	<b>6,9</b>
Phytosphingosin (2)	7,2
Phytosphingosin (2)	6,5
Phytosphingosin (2)	12,6
<b>Mittelwert total-RNA</b>	<b>8,7</b>
N-Acetyl-phytosphingosin (4d)	9,0
N-Acetyl-phytosphingosin (4d)	8,2
N-Acetyl-phytosphingosin (4d)	6,2
<b>Mittelwert total-RNA</b>	<b>7,8</b>
N-Hexaoyl-phytosphingosin (4b)	7,3
N-Hexaoyl-phytosphingosin (4b)	8,4
N-Hexaoyl-phytosphingosin (4b)	9,0
<b>Mittelwert total-RNA</b>	<b>8,2</b>
N-Stearoyl-phytosphingosin (4c)	6,2
N-Stearoyl-phytosphingosin (4c)	8,6
N-Stearoyl-phytosphingosin (4c)	6,0
<b>Mittelwert total-RNA</b>	<b>6,9</b>
N-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	8,3
N-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	-
N-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)	9,3
<b>Mittelwert total-RNA</b>	<b>8,8</b>

### 9.4.5 Auswertung der Real time Polymerase chain reaction (RT-PCR) (reverse Transcription)

Die isolierten total-RNA-Mengen werden in cDNA umgeschrieben und anschließend mit den jeweiligen Primerpaaren versetzt und mittels des RT-PCR Gerätes DNA Engine Opticon analysiert.



**Abbildung 15:** Beispiel eine RT-PCR Cyclers [[www.gene-quantification.de/platform3.html](http://www.gene-quantification.de/platform3.html)]

#### **Berechnung des PCR-Protokolls**

CT-Wert: Der Schwellenwert-Zyklus (threshold cycle, CT) ist die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals den Schwellenwert erreicht.

Der Threshold (Schwellenwert) wird im logarithmischen Anstieg der Fluoreszenz in den Bereich gelegt, wo alle Proben eine parallelen Kurvenverlauf aufweisen (d.h. in der initialen log-Phase). Dieser Schwellenwert ist die Trennlinie zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz. Die relative Quantifizierung der Real-Time-PCR erfolgte über die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Dabei wird die relative Expression eines Zielgens (z.B. TGM 1) bezogen auf die konstante Expression des Referenzgens (= endogene Kontrolle, z.B. Actin) bestimmt. Dazu wird die Differenz zwischen den CT-Werten des Zielgens und des Referenzgens gebildet (=  $\Delta\text{CT}$ ).

Eine Verdopplung der Ausgangs-cDNA führt zu einem um einen Zyklus früheren CT-Wert, da mit jedem Zyklus eine Verdopplung des Amplifikats erfolgt.

Zur Ermittlung von Veränderungen in der Expression eines Gens ( $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert) wird die Differenz zwischen den  $\Delta\text{CT}$ -Werten der verschiedenen Proben und dem  $\Delta\text{CT}$ -Wert des Kalibrators (unbehandelte Kontrolle) gebildet.

**Berechnung:**

1. CT-Zielgen – CT-Endogene Kontrolle ( $\Delta CT$ )
2.  $\Delta CT$  Probe -  $\Delta CT$  Kalibrator ( $\Delta\Delta CT$ )
3. Berechnung des Ergebnisses:  $2^{-\Delta\Delta CT}$

**Tabelle 21:** Beispiel Berechnung des  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wertes

Bezeichnung	CT-Wert Zielgen	CT-Wert Kontrolle	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kalibrator ACTB	25	20	5	0	1,00
Zielgen PS-SLC	30	20	10	5	0,03

Eine Auswertung der RT-PCR-Daten erfolgt computerunterstützt mit der Software Opticon Monitor Analysis. Nach Berechnung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte werden diese gegeneinander aufgetragen. Eine markante Induzierung der Gene wird bei einem  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von 3,00 definiert, eine Reprimierung bei einem  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte von 0,33.

#### 9.4.6 CT-Werte der Kontrollen 24 und 72 Stunden (siehe Kapitel 4.7.3, Abbildung 47)

**Tabelle 22:** Nummerierung der Substanzen

Nummer	Bezeichnung
16,17,18	Leerformulierung (24 h)
34,35,36	Leerformulierung (72 h)

**Tabelle 23:** CT-Werte ACTB

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
ACTB	1. Lauf	2.Lauf	ACTB	1. Lauf	2.Lauf	ACTB	1. Lauf	2.Lauf
16	19,89	20,95	17	22,53	21,07	18	20,86	20,09
34	18,24	16,58	35	20,83	20,02	36	19,93	20,42

**Tabelle 24:**  $\bar{\Delta}$  CT-Wert ACTB

ACTB	$\bar{\Delta}$ CT-Wert
16,17,18	20,90
34,35,36	19,34

**Tabelle 25:** CT-Werte ARP

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
ARP	1. Lauf	2.Lauf	ARP	1. Lauf	2.Lauf	ARP	1. Lauf	2.Lauf
16	22,07	22,56	17	24,15	23,15	18	22,18	22,00
34	20,92	20,10	35	23,08	20,48	36	24,24	22,44

**Tabelle 26:** Ø CT-Wert ARP

ARP	Ø CT-Wert
16,17,18	22,69
34,35,36	21,88

**Tabelle 27:** CT-Werte MMP 1

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
MMP 1	1. Lauf	2.Lauf	MMP 1	1. Lauf	2.Lauf	MMP 1	1. Lauf	2.Lauf
16	27,10	26,08	17	30,19	30,26	18	27,51	26,39
34	-	-	35	26,23	26,43	36	28,12	29,12

**Tabelle 28:** Ø CT-Wert MMP 1

MMP 1	Ø CT-Wert
16,17,18	27,92
34,35,36	27,48

**Tabelle 29:** CT-Werte Aquaporin 3

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Aqua- porin 3	1. Lauf	2.Lauf	Aqua- porin 3	1. Lauf	2.Lauf	Aqua- porin 3	1. Lauf	2.Lauf
16	20,57	20,83	17	23,08	23,23	18	21,08	21,15
34	-	-	35	22,30	22,45	36	21,58	21,51

**Tabelle 30:** Ø CT-Wert Aquaporin 3

Aquaporin 3	Ø CT-Wert
16, 17, 18	21,66
34, 35, 36	21,96

**Tabelle 31:** CT-Werte Kollagen VII

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf	Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf	Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf
16	22,46	21,82	17	23,08	27,20	18	22,45	23,09
34	24,03	27,44	35	21,43	26,31	36	26,77	-

**Tabelle 32:** Ø CT-Wert Kollagen VII

Kollagen VII	Ø CT-Wert
16, 17, 18	23,35
34, 35, 36	25,20

**Tabelle 33:** CT-Werte Transglutaminase1

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Transglut aminase 1	1. Lauf	2.Lauf	Transglut aminase 1	1. Lauf	2.Lauf	Transglut aminase 1	1. Lauf	2.Lauf
16	23,78	24,74	17	22,26	23,03	18	21,36	21,90
34	21,87	20,30	35	21,42	21,39	36	22,96	23,39

**Tabelle 34:** Ø CT-Wert Transglutaminase1

Transglutaminase 1	Ø CT-Wert
16, 17, 18	22,85
34, 35, 36	21,89



**Tabelle 35:** CT-Werte Keratin 10

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf
16	16,56	17,09	17	20,84	20,11	18	20,04	19,22
34	19,03	20,35	35	24,42	21,14	36	24,86	22,38

**Tabelle 36:** Ø CT-Wert Keratin 10

Keratin 10	Ø CT-Wert
16, 17, 18	18,98
34, 35, 36	22,03

**Tabelle 37:** CT-Werte Keratin 5

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf
16	17,39	17,79	17	20,67	20,13	18	20,09	19,74
34	17,63	16,54	35	21,00	20,17	36	22,31	21,04

**Tabelle 38:** Ø CT-Wert Keratin 5

Keratin 5	Ø CT-Wert
16, 17, 18	19,30
34, 35, 36	19,78

**Tabelle 39:** CT-Werte Profilaggrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Pro-filaggrin	1. Lauf	2.Lauf	Pro-filaggrin	1. Lauf	2.Lauf	Pro-filaggrin	1. Lauf	2.Lauf
16	20,15	20,33	17	21,57	21,99	18	20,31	20,34
34	20,21	19,92	35	20,83	20,60	36	22,65	22,46

**Tabelle 40:** Ø CT-Wert Profilaggrin

Profilaggrin	Ø CT-Wert
16, 17, 18	20,78
34, 35, 36	21,11

**Tabelle 41:** CT-Werte Loricrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Loricrin	1. Lauf	2.Lauf	Loricrin	1. Lauf	2.Lauf	Loricrin	1. Lauf	2.Lauf
16	24,21	25,28	17	24,59	24,71	18	22,21	22,17
34	22,94	21,84	35	24,04	23,75	36	23,12	22,78

**Tabelle 42:** Ø CT-Wert Loricrin

Loricrin	Ø CT-Wert
16, 17, 18	23,86
34, 35, 36	23,08

**Tabelle 43:** CT-Werte Skalp

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Skalp	1. Lauf	2.Lauf	Skalp	1. Lauf	2.Lauf	Skalp	1. Lauf	2.Lauf
16	21,46	22,34	17	21,11	--	18	20,55	
34	18,29	17,99	35	20,25	-	36	21,19	

**Tabelle 44:** Ø CT-Wert Skalp

Skalp	Ø CT-Wert
16, 17, 18	21,36
34, 35, 36	19,43

**Tabelle 45:** CT-Werte Involucrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Involucrin	1. Lauf	2.Lauf	IL 8	1. Lauf	2.Lauf	IL 8	1. Lauf	2.Lauf
16	-	-	17	21,05	20,58	18	20,25	20,17
34	-	-	35	20,34	20,25	36	22,24	22,09

**Tabelle 46:** Ø CT-Wert Involucrin

Involucrin	Ø CT-Wert
16, 17, 18	20,51
34, 35, 36	21,23

### 9.4.7 CT-Werte der menschlichen Haut RNA (siehe Kapitel 4.7.3, Abbildung 47)

**Tabelle 47;** CT-Werte ACTB

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
ACTB	1. Lauf	2.Lauf	ACTB	1. Lauf	2.Lauf	ACTB	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	19,85	20,07	Human skin	20,02	20,03	Human skin	19,89	20,03

**Tabelle 48;** Ø CT-Wert ACTB

ACTB	Ø CT-Wert
16, 17, 18	19,98

**Tabelle 49:** CT-Werte ARP

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
ARP	1. Lauf	2.Lauf	ARP	1. Lauf	2.Lauf	ARP	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	20,14	20,30	Human skin	20,26	20,28	Human skin	20,29	20,20

**Tabelle 50:** Ø CT-Wert ARP

ARP	Ø CT-Wert
Human skin	20,24

**Tabelle 51:** CT-Werte MMP 1

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
MMP 1	1. Lauf	2.Lauf	MMP 1	1. Lauf	2.Lauf	MMP 1	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	30,36	31,73	Human skin	31,40	30,66	Human skin	31,26	32,14

**Tabelle 52:** Ø CT-Wert MMP 1

MMP 1	Ø CT-Wert
Human skin	31,26

**Tabelle 53:** CT-Werte Aquaporin 3

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Aqua-porin 3	1. Lauf	2.Lauf	Aqua-porin 3	1. Lauf	2.Lauf	Aqua-porin 3	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	20,27	20,19	Human skin	20,21	20,14	Human skin	20,18	-

**Tabelle 54:** Ø CT-Wert Aquaporin 3

Aquaporin 3	Ø CT-Wert
Human skin	20,20

**Tabelle 55:** CT-Werte Kollagen VII

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf	Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf	Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	22,59	20,24	Human skin	21,29	19,53	Human skin	-	-

**Tabelle 56:** Ø CT-Wert Kollagen VII

Kollagen VII	Ø CT-Wert
Human skin	20,91

**Tabelle 57:** CT-Werte Transglutaminase 1

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf	Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf	Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	24,42	22,90	Human skin	22,43	23,77	Human skin	24,17	24,01

**Tabelle 58:** Ø CT-Wert Transglutaminase 1

Transglutaminase 1	Ø CT-Wert
Human skin	23,62

**Tabelle 59:** CT-Werte Keratin 10

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	19,09	19,16	Human skin	19,14	19,15	Human skin	19,19	19,15

**Tabelle 60:** Ø CT-Wert Keratin 10

Keratin 10	Ø CT-Wert
Human skin	19,15

**Tabelle 61:** CT-Werte Keratin 5

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	20,01	20,62	Human skin	19,66	19,43	Human skin	20,21	-

**Tabelle 62:** Ø CT-Wert Keratin 5

Keratin 5	Ø CT-Wert
Human skin	19,99

**Tabelle 63:** CT-Werte Profilaggrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf	Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf	Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	21,47	21,23	Human skin	21,57	21,40	Human skin	21,75	21,71

**Tabelle 64:** Ø CT-Wert Profilaggrin

Profilaggrin	Ø CT-Wert
Human skin	21,52

**Tabelle 65:** CT-Werte Loricrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Loricrin	1. Lauf	2.Lauf	Loricrin	1. Lauf	2.Lauf	Loricrin	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	20,25	20,43	Human skin	18,73	18,55	Human skin	18,31	18,58

**Tabelle 66:** Ø CT-Wert Loricrin

Loricrin	Ø CT-Wert
Human skin	19,31

**Tabelle 67:** CT-Werte Skalp

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Skalp	1. Lauf	2.Lauf	Skalp	1. Lauf	2.Lauf	Skalp	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	24,33	22,42	Human skin	21,55	24,33	Human skin	24,48	24,54

**Tabelle 68:** Ø CT-Wert Skalp

Skalp	Ø CT-Wert
Human skin	23,61

**Tabelle 69:** CT-Werte Involucrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Involucrin	1. Lauf	2.Lauf	IL 8	1. Lauf	2.Lauf	IL 8	1. Lauf	2.Lauf
Human skin	22,65	22,29	Human skin	20,44	-	Human skin	-	-

**Tabelle 70:** Ø CT-Wert Involucrin

Involucrin	Ø CT-Wert
Human skin	21,79

### 9.4.8 CT- und $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der 24 und 72 Stunden Hautmodelle nach Behandlung mit Retinol (siehe Kapitel 4.7.4, Abbildung 52)

Tabelle 71: Nummerierung der Substanzen

Nummer	Bezeichnung
4,5,6	Retinol (24 h)
22,23,24	Retinol (72 h)

Tabelle 72: CT-Werte ACTB

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
ACTB	1. Lauf	2.Lauf	ACTB	1. Lauf	2.Lauf	ACTB	1. Lauf	2.Lauf
4	18,87	19,20	5	21,18	20,89	6	20,74	20,06
22	17,83	19,18	23	20,24	21,21	24	22,17	20,02

Tabelle 73: CT-Werte ARP

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
ARP	1. Lauf	2.Lauf	ARP	1. Lauf	2.Lauf	ARP	1. Lauf	2.Lauf
4	21,36	21,35	5	24,69	23,28	6	23,21	21,67
22	21,22	22,17	23	22,49	23,20	24	21,56	20,45

Tabelle 74:  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte ARP

ARP	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	22,17	0,69
22,23,24	21,58	1,52

Tabelle 75: CT-Werte MMP 1

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
MMP 1	1. Lauf	2.Lauf	MMP 1	1. Lauf	2.Lauf	MMP 1	1. Lauf	2.Lauf
4	29,32	29,12	5	29,72	29,92	6	27,84	26,44
22	24,50	25,56	23	27,68	28,33	24	25,58	26,70

Tabelle 76:  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte MMP 1

MMP 1	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	29,18	0,11
22,23,24	26,39	3,61

Tabelle 77: CT-Werte Aquaporin 3

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Aqua-porin 3	1. Lauf	2.Lauf	Aqua-porin 3	1. Lauf	2.Lauf	Aqua-porin 3	1. Lauf	2.Lauf
4	20,44	20,43	5	23,01	22,74	6	20,33	20,46
22	20,40	20,45	23	21,73	-	24	20,48	20,47

Tabelle 78:  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Aquaporin 3

Aquaporin 3	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	21,24	0,80
22, 23, 24	20,71	4,08

**Tabelle 79:** CT-Werte Kollagen VII

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf	Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf	Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf
4	23,32	23,23	5	22,16	26,04	6	23,95	24,73
22	24,01	23,88	23	26,84	-	24	26,31	23,70

**Tabelle 80:**  $\bar{\sigma}$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Kollagen VII

Kollagen VII	$\bar{\sigma}$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	23,48	0,32
22, 23, 24	24,95	3,90

**Tabelle 81:** CT-Werte Transglutaminase I

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf	Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf	Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf
4	22,07	22,64	5	22,58	22,78	6	21,13	21,30
22	24,16	25,41	23	24,38	25,11	24	22,36	23,17

**Tabelle 82:**  $\bar{\sigma}$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Transglutaminase I

Transglutaminase 1	$\bar{\sigma}$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	22,08	0,99
22, 23, 24	24,11	2,71

**Tabelle 83:** CT-Werte Keratin 10

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf
4	18,08	17,79	5	21,84	20,46	6	21,09	20,12
22	27,38	29,15	23	28,70	-	24	28,37	27,24

**Tabelle 84:**  $\bar{\sigma}$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Keratin 10

Keratin 10	$\bar{\sigma}$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	20,88	0,36
22, 23, 24	28,17	0,02

**Tabelle 85:** CT-Werte Keratin 5

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf
4	17,07	18,20	5	19,62	20,29	6	20,69	20,09
22	18,87	20,05	23	20,80	-	24	20,46	20,14

**Tabelle 86:**  $\bar{\sigma}$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Keratin 5

Keratin 5	$\bar{\sigma}$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	19,33	1,06
22, 23, 24	20,06	3,58

**Tabelle 87:** CT-Werte Profilaggrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf	Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf	Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf
4	19,25	19,44	5	22,10	22,16	6	21,04	20,99
22	25,02	25,71	23	26,07	-	24	24,96	24,69

**Tabelle 88:**  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Profilaggrin

Profilaggrin	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	20,83	0,58
22, 23, 24	25,29	0,09

**Tabelle 89:** CT-Werte Loricrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Loricrin	1. Lauf	2.Lauf	Loricrin	1. Lauf	2.Lauf	Loricrin	1. Lauf	2.Lauf
4	23,71	23,21	5	26,00	26,63	6	22,75	23,11
22	27,50	28,42	23	27,56	-	24	23,91	25,24

**Tabelle 90:**  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Loricrin

Loricrin	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	23,20	0,95
22, 23, 24	21,18	6,37

**Tabelle 91:** CT-Werte Skalp

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Skalp	1. Lauf	2.Lauf	Skalp	1. Lauf	2.Lauf	Skalp	1. Lauf	2.Lauf
4	19,07	19,29	5	21,38	-	6	20,27	-
22	21,46	22,26	23	22,32	22,38	24	21,01	-

**Tabelle 92:**  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Skalp

Skalp	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	20,00	1,54
22, 23, 24	21,88	0,31

**Tabelle 93:** CT-Werte Involucrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Involucrin	1. Lauf	2.Lauf	IL 8	1. Lauf	2.Lauf	IL 8	1. Lauf	2.Lauf
4	-	-	5	21,75	21,25	6	20,15	20,15
22	-	-	23	21,71	22,04	24	20,18	20,05

**Tabelle 94:**  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Involucrin

Involucrin	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
4, 5, 6	20,83	0,48
22, 23, 24	20,99	2,01

### 9.4.9 CT- und $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der 48 Stunden Hautmodelle (Wirkstoffe) (siehe Kapitel 4.10, Abbildung 57 - 63)

**Tabelle 95:** Nummerierung der Substanzen

Nummer	Bezeichnung
1,2,3	Leerformulierung
4,5,6	Leerformulierung
10,11,12	Retinol
13,14,15	Phytosphingosin (2)
16,17,18	N-Acetyl-phytosphingosin (4d)
19,20,21	N-Hexanoyl-phytosphingosin (4b)
22,23,24	N-Stearoyl-phytosphingosin (4c)
25,26	N-Salicyloyl-phytosphingosin (4a)

**Tabelle 96:** CT-Werte ACTB

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
ACTB	1. Lauf	2.Lauf	ACTB	1. Lauf	2.Lauf	ACTB	1. Lauf	2.Lauf
1	20,39	20,60	2	20,18	20,31	3	20,33	20,55
4	20,17	20,45	5	20,14	20,17	6	20,09	20,22
10	20,20	20,32	11	20,12	20,17	12	20,12	20,23
13	20,22	21,00	14	20,23	20,79	15	20,72	21,16
16	20,24	20,50	17	20,31	21,41	18	19,92	20,34
19	20,13	20,77	20	20,12	20,97	21	20,14	20,74
22	20,11	20,78	23	20,13	20,67	24	20,12	20,85
25	20,36	21,29	26	20,61	22,19			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 97:** CT-Werte ARP

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
ARP	1. Lauf	2.Lauf	ARP	1. Lauf	2.Lauf	ARP	1. Lauf	2.Lauf
1	22,53	22,79	2	21,12	22,09	3	21,59	22,57
4	21,03	22,88	5	20,86	21,47	6	20,71	21,36
10	21,31	22,38	11	21,32	21,68	12	21,27	21,80
13	20,96	23,31	14	20,91	23,24	15	21,98	23,18
16	21,36	22,46	17	20,83	23,49	18	20,61	22,78
19	20,65	23,28	20	20,58	23,03	21	20,74	22,56
22	20,78	23,75	23	20,99	23,39	24	21,06	23,24
25	21,72	23,66	26	22,00	25,31			
Wasser	34,18042	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 98:**  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte ARP

ARP	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
10, 11, 12	21,63	1,03
13, 14, 15	22,26	0,93
16, 17, 18	21,92	1,00
19, 20, 21	21,81	1,11
22, 23, 24	22,20	0,82
25, 26	23,17	0,66
Wasser	-	-



**Tabelle 99:** CT-Werte MMP 1

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
MMP 1	1. Lauf	2.Lauf	MMP 1	1. Lauf	2.Lauf	MMP 1	1. Lauf	2.Lauf
1	29,25	29,59	2	27,04	27,57	3	27,23	29,45
4	27,19	29,25	5	24,69	24,19	6	27,51	28,38
10	27,19	29,56	11	26,68	29,18	12	29,19	30,71
13	29,32	30,40	14	30,19	29,59	15	30,86	30,08
16	30,19	30,22	17	30,33	32,03	18	24,22	25,24
19	28,25	31,00	20	27,98	30,12	21	25,43	27,80
22	26,37	28,71	23	26,30	27,56	24	27,93	29,98
25	26,42	28,98	26	27,99	31,31			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 100:** Ø CT- und  $2^{-\Delta\text{ACT}}$ -Werte MMP 1

MMP 1	Ø CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\text{ACT}}$
10, 11, 12	29,17	0,48
13, 14, 15	30,07	0,36
16, 17, 18	30,69	0,20
19, 20, 21	29,03	0,64
22, 23, 24	27,81	1,47
25, 26	27,80	2,35
Wasser	-	0,00

**Tabelle 101:** CT-Werte Aquaporin 3

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Aqua- porin 3	1. Lauf	2.Lauf	Aqua- porin 3	1. Lauf	2.Lauf	Aqua- porin 3	1. Lauf	2.Lauf
1	21,10	21,39	2	20,86	21,31	3	20,89	21,64
4	20,96	21,22	5	20,35	20,50	6	20,49	21,21
10	20,21	20,47	11	20,22	20,50	12	20,22	20,39
13	20,75	22,50	14	20,60	22,40	15	20,95	22,51
16	20,60	21,56	17	20,87	22,45	18	20,21	21,27
19	20,56	22,05	20	20,35	22,69	21	20,37	21,95
22	20,43	22,24	23	20,54	22,15	24	20,59	22,39
25	20,86	20,93	26	21,41	22,27			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 102:** Ø CT- und  $2^{-\Delta\text{ACT}}$ -Werte Aquaporin 3

Aquaporin 3	Ø CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\text{ACT}}$
10, 11, 12	20,33	1,47
13, 14, 15	21,62	0,85
16, 17, 18	21,16	0,99
19, 20, 21	21,33	0,90
22, 23, 24	21,39	0,84
25, 26	21,37	1,36
Wasser	-	0,00

**Tabelle 103:** CT-Werte Kollagen VII

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf	Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf	Kollagen VII	1. Lauf	2.Lauf
1	24,29	26,23	2	24,22	25,02	3	24,42	26,30
4	24,15	24,42	5	22,10	22,88	6	22,57	25,16
10	23,76	25,96	11	24,13	25,42	12	24,21	25,63
13	22,42	24,40	14	22,49	24,00	15	23,62	25,26
16	26,16	24,45	17	22,03	24,70	18	21,34	23,39
19	22,14	23,74	20	22,10	23,87	21	22,11	23,87
22	22,53	24,53	23	23,28	25,07	24	22,80	24,65
25	23,61	25,72	26	23,60	26,99			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-
Human skin	22,59437		Human skin			Human skin		

**Tabelle 104:** Ø CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Kollagen VII

Kollagen VII	Ø CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
10, 11, 12	24,85	0,63
13, 14, 15	23,70	1,99
16, 17, 18	23,64	1,76
19, 20, 21	22,97	2,84
22, 23, 24	23,81	1,56
25, 26	24,31	1,75
Wasser	-	0,00

**Tabelle 105:** CT-Werte Transglutaminase 1

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf	Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf	Transglutaminase 1	1. Lauf	2.Lauf
1	22,79	24,27	2	21,49	23,95	3	21,89	24,49
4	21,75	23,88	5	21,40	22,34	6	21,18	21,64
10	21,87	22,38	11	22,10	22,20	12	22,07	22,48
13	21,66	24,11	14	21,50	23,61	15	22,62	23,88
16	22,58	23,41	17	21,80	24,35	18	20,56	22,25
19	21,68	23,54	20	21,39	23,94	21	21,41	23,44
22	21,30	23,31	23	21,76	23,90	24	21,91	24,22
25	23,06	24,60	26	23,06	26,19			
Wasser	-	-	-	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 106:** Ø CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Transglutaminase 1

Transglutaminase 1	Ø CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
10, 11, 12	22,18	0,87
13, 14, 15	22,51	0,98
16, 17, 18	22,49	0,84
19, 20, 21	22,57	0,82
22, 23, 24	22,73	0,71
25, 26	23,57	0,63
Wasser	-	0,00

**Tabelle 107:** CT-Werte Keratin 10

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 10	1. Lauf	2.Lauf
1	19,41	20,07	2	19,18	19,75	3	19,39	20,24
4	19,16	20,03	5	19,14	19,22	6	19,08	19,32
10	19,40	20,17	11	19,60	20,23	12	19,43	20,16
13	19,12	20,04	14	19,15	19,73	15	20,04	20,26
16	19,40	19,50	17	19,15	20,09	18	19,10	20,10
19	19,09	19,88	20	19,11	20,03	21	19,11	20,10
22	19,27	20,37	23	19,50	20,42	24	19,24	20,33
25	19,79		26	19,91	21,08			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 108:** Ø CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Keratin 10

Keratin 10	Ø CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
10, 11, 12	19,83	0,74
13, 14, 15	19,72	1,12
16, 17, 18	19,56	1,07
19, 20, 21	19,55	1,09
22, 23, 24	19,85	0,86
25, 26	20,26	1,04
Wasser	-	0,00

**Tabelle 109:** CT-Werte Keratin 5

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf	Keratin 5	1. Lauf	2.Lauf
1	20,19	20,29	2	20,03	20,15	3	20,14	20,43
4	19,79	20,12	5	19,66	20,04	6	20,01	20,17
10	20,18	20,27	11	20,17	20,28	12	20,22	20,34
13	20,01	20,62	14	20,06	20,33	15	20,28	20,67
16	20,20	20,25	17	20,14	20,70	18	19,62	20,23
19	20,02	20,27	20	19,62	20,59	21	19,54	20,29
22	19,82	20,45	23	20,02	20,40	24	20,03	20,46
25	20,14		26	20,21				
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 110:** Ø CT- und  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte Keratin 5

Keratin 5	Ø CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\Delta CT}$
10, 11, 12	20,24	0,83
13, 14, 15	20,33	1,10
16, 17, 18	20,19	1,03
19, 20, 21	20,06	1,15
22, 23, 24	20,20	1,02
25, 26	20,17	1,65
Wasser	-	0,00

**Tabelle 111:** CT-Werte Profilaggrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf	Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf	Profilaggrin	1. Lauf	2.Lauf
1	20,27	20,21	2	20,15	20,22	3	20,19	20,28
4	20,24	20,29	5	20,09	20,17	6	20,14	20,23
10	20,24	20,16	11	20,17	20,20	12	20,28	20,18
13	20,20	20,19	14	20,16	20,10	15	-	20,24
16	20,75	20,17	17	20,44	20,34	18	20,10	20,12
19	20,22	20,21	20	20,28	20,30	21	20,28	20,28
22	20,22	20,13	23	20,49	20,26	24	20,30	20,21
25	20,34	22,18	26	20,33	25,09			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 112:** Ø CT- und  $2^{-\Delta\text{ACT}}$ -Werte Profilaggrin

Profilaggrin	Ø CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\text{ACT}}$
10, 11, 12	20,21	0,93
13, 14, 15	20,18	1,34
16, 17, 18	20,32	1,04
19, 20, 21	20,26	1,09
22, 23, 24	20,27	1,46
25, 26	21,98	0,71
Wasser	-	0,00

**Tabelle 113:** CT-Werte Loricrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Loricrin	1. Lauf	2.Lauf	Loricrin	1. Lauf	2.Lauf	Loricrin	1. Lauf	2.Lauf
1	21,43	21,21	2	20,63	20,65	3	21,07	21,73
4	20,93	20,97	5	20,42	20,31	6	20,37	20,64
10	20,73	21,05	11	20,37	20,52	12	20,47	20,63
13	20,57	20,79	14	20,56	20,56	15	20,88	20,86
16	21,25	20,34	17	21,26	21,18	18	20,32	20,89
19	21,03	21,23	20	21,11	21,85	21	20,58	21,07
22	20,61	21,21	23	21,35	21,07	24	21,11	21,44
25	21,06	24,81	26	21,74	25,11			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 114:** Ø CT- und  $2^{-\Delta\text{ACT}}$ -Werte Loricrin

Loricrin	Ø CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\text{ACT}}$
10, 11, 12	20,63	0,90
13, 14, 15	20,70	0,96
16, 17, 18	20,87	0,90
19, 20, 21	21,15	0,90
22, 23, 24	21,13	0,90
25, 26	23,18	1,43
Wasser	-	0,00

**Tabelle 115:** CT-Werte Skalp

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Skalp	1. Lauf	2.Lauf	Skalp	1. Lauf	2.Lauf	Skalp	1. Lauf	2.Lauf
1	22,28	20,73	2	21,20	20,18	3	21,24	20,77
4	21,70	20,86	5	20,93	20,61	6	21,44	21,56
10	20,59	20,94	11	20,36	20,91	12	20,57	20,50
13	22,19	21,88	14	21,60	21,11	15	22,81	20,85
16	23,01	23,22	17	22,55	22,65	18	20,49	20,25
19	22,20	21,07	20	22,12	21,21	21	21,99	20,88
22	21,06	22,44	23	21,29	21,45	24	22,02	22,16
25	21,21	20,91	26	22,07	20,68			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 116:**  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\text{ACT}}$ -Werte Skalp

Skalp	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\text{ACT}}$
10, 11, 12	20,65	1,30
13, 14, 15	21,74	0,86
16, 17, 18	22,03	0,60
19, 20, 21	21,58	0,83
22, 23, 24	21,74	0,72
25, 26	21,22	1,65
Wasser	-	0,00

**Tabelle 117:** CT-Werte Involucrin

Hautmodell 1			Hautmodell 2			Hautmodell 3		
Involucrin	1. Lauf	2.Lauf	IL 8	1. Lauf	2.Lauf	IL 8	1. Lauf	2.Lauf
1	20,53	23,16	2	20,29	23,09	3	21,00	21,50
4	20,63	21,39	5	20,21	21,59	6	20,44	21,47
10	20,34	20,21	11	20,57	20,07	12	20,42	20,16
13	20,73	20,14	14	20,66	20,19	15	20,69	20,22
16	20,69	20,15	17	21,13	20,25	18	20,26	20,17
19	20,58	20,32	20	20,68	20,17	21	21,02	20,27
22	20,61	20,06	23	21,03	20,17	24	20,68	20,10
25	20,79	20,49	26	21,36	22,16			
Wasser	-	-	Wasser	-	-	Wasser	-	-

**Tabelle 118:**  $\emptyset$  CT- und  $2^{-\Delta\text{ACT}}$ -Werte Involucrin

Involucrin	$\emptyset$ CT-Wert	Ergebnis $2^{-\Delta\text{ACT}}$
10, 11, 12	20,26	1,90
13, 14, 15	20,30	2,61
16, 17, 18	20,44	2,01
19, 20, 21	20,44	2,04
22, 23, 24	20,51	1,90
25, 26	20,44	3,16
Wasser	-	0,00